



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

**Aplicação de técnicas de conservação *in vitro*
para a conservação de espécies ameaçadas**

Dissertação de mestrado integrado em Engenharia Biológica

LAURA DIOGO RAMOS FERNANDES

FARO

2008



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

**Aplicação de técnicas de conservação *in vitro*
para a conservação de espécies ameaçadas**

Dissertação de mestrado integrado em Engenharia Biológica

Orientador: Doutora Anabela Romano

Co-orientador: Doutora Sandra Gonçalves

LAURA DIOGO RAMOS FERNANDES

FARO

2008

Declaração

Na presente dissertação apresentam-se resultados para serem alvo de publicação em colaboração com A. Romano, F. Pérez-García, M.E. González-Benito e S. Gonçalves.

A autora declara que interveio na concepção e execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redação do manuscrito enviado para publicação.

Agradecimentos

O primeiro agradecimento é dirigido à Prof.^a Doutora Anabela Romano, pela oportunidade e confiança para levar a cabo este trabalho de investigação. Pelo espírito, interesse, motivação, disponibilidade e orientação. Muito obrigado por tudo.

À Doutora Sandra Gonçalves, incansável e sempre disposta a prestar ajuda. Obrigado pela confiança, pelas horas, pela partilha de conhecimentos, pela boa disposição e acima de tudo pela amizade.

À Doutora Elena González Benito e ao Doutor Félix Pérez García (Universidade Politécnica de Madrid) agradeço a disponibilidade, simpatia, conhecimentos científicos partilhados e para além disso por me terem recebido tão gentilmente em Madrid durante a acção COST. Muito obrigado.

Ao responsável da acção COST 871, Doutor Bart Panis, agradeço a oportunidade de integrar o programa STSMs (“Short Term Scientific Missions”) e por me proporcionarem uma experiência científica única em Madrid.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela boa disposição, amizade e pelo agradável ambiente de trabalho que me proporcionaram.

Aos meus amigos, saberão certamente identificar-se, pela companhia, pelas experiências, pela diversão, pela boa disposição e pelos bons momentos que me ofereceram durante todo o meu percurso académico.

Ao Pedro, pela força incansável e pela frase repetida vezes sem conta: “Não deites a toalha ao chão”. Obrigado por todas as palavras de motivação e pela paciência.

À Célia e Orlando por me “adoptarem” em sua casa. Obrigado pelo carinho e amizade.

A toda a minha família, em especial aos meus avós. Pelo carinho, pelos desabafos, pela compreensão e confiança.

Aos meus pais, sem eles nada seria possível. Agradeço a oportunidade, a compreensão, o incentivo e a confiança que sempre depositaram em mim. Obrigado por tudo.

Não poderia acabar os agradecimentos sem agradecer à minha irmã Ana, por me tornar uma pessoa melhor, com mais força para ultrapassar obstáculos e tornar reais os meus sonhos. Sempre presente...

A todas as pessoas, que embora não tenham sido mencionadas, contribuíram de algum modo para a realização desta dissertação.

Abreviaturas

BA	Benziladenina
DMSO	Dimetilsulfóxido
g, mg	Grama, miligrama
h, min, s	Horas, minutos, segundos
IBA	Ácido indol 3-butírico
Kin	6-furfurilaminopurina (=cinetina)
LN	Azoto líquido
ml, µl	Mililitro, microlitro
cm, mm	Centímetro, milímetro
M, mM, µmol	Molar, milimolar, micromole
MS	Meio de cultura Murashige & Skoog (1962)
NAA	Ácido α -naftaleno 1-acético
°C	Grau centígrado
P	Probabilidade estatística
p/v	Peso por volume
PVS2	“Plant Vitrification Solution nº 2”
rpm	Rotações por minuto
SPSS	“Statistical Package for the Social Sciences”
Tween 20	<i>Polioxietileno sorbitano monolaurato</i>
UV	Radiação ultravioleta
v/v	Volume por volume
Zea	Zeatina

Nome: Laura Diogo Ramos Fernandes

Faculdade: Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

Orientador: Prof. Doutora Anabela Romano

Co-orientadora: Doutora Sandra Gonçalves

Data: Setembro de 2008

Título: Aplicação de técnicas de conservação *in vitro* para a conservação de espécies ameaçadas

Resumo

É cada vez maior o número de espécies que se encontram ameaçadas de extinção no seu habitat natural, existindo uma necessidade crescente de elaborar estratégias para a sua conservação. Com os avanços na área da biotecnologia vegetal tal torna-se possível, recorrendo por exemplo a técnicas de cultura *in vitro*. Este trabalho focou-se em duas espécies endémicas algarvias, *Tuberaria major* e *Plantago algarbiensis*, que apesar de se saber que se encontram em perigo de extinção, nada foi feito no sentido de estabelecer métodos que visem a sua conservação.

Relativamente à espécie *T. major* foi estudada a germinação *in vitro* de sementes e a partir dos rebentos originados estabeleceu-se um protocolo de micropropagação tendo em vista a produção em massa de plantas. O meio MS com 0,2 mg l⁻¹ Zea demonstrou ser o meio mais eficaz para produzir elevada quantidade de rebentos. Na fase de enraizamento, a redução dos sais do meio basal foi o parâmetro que mais contribuiu para o sucesso desta fase. Após 6 semanas de aclimatização obteve-se um máximo de 97% de sobrevivência. Numa fase posterior foram estudadas duas vias de conservação de germoplasma desta espécie, a criopreservação de sementes e a criopreservação de ápices recorrendo a três métodos distintos, a vitrificação, a vitrificação “droplet” e o encapsulamento-desidratação. O encapsulamento-desidratação demonstrou ser o método mais eficaz, no qual 67% dos ápices formaram rebentos após criopreservação.

No caso de *P. algarbiensis* foi estudada a organogénese a partir de explantados foliares destacados de rebentos provenientes de germinação *in vitro* de sementes. Os melhores resultados em termos de formação de rebentos foram observados em meio MS suplementado com 4 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ IAA.

Este trabalho demonstra que as técnicas de conservação *in vitro* podem ser utilizadas com sucesso para a conservação das espécies *T. major* e *P. algarbiensis*.

Palavras chave: Conservação; espécies ameaçadas de extinção; germinação *in vitro*; micropropagação; organogénese; criopreservação *in vitro*.

Title: Application of *in vitro* conservation techniques for the conservation of endangered species

Abstract

The number of threatened species in their natural habitat is increasing, thus it is urgent to implement new conservation strategies. The advances in biotechnology, namely the use of *in vitro* culture techniques, make this possible. This work is mainly focused on two endemic species from the Algarve region, *Tuberaria major* and *Plantago algarbiensis*. Despite the lack of information about these two species it is known their threaten state. For *T. major* the *in vitro* germination of seeds was studied, and with the originated seedlings a micropropagation protocol was initiated in order to mass propagate this species. The MS medium supplemented with 0,2 mg l⁻¹ Zea was the most effective to produce high number of shoots. During the rooting phase the reduction of MS macronutrients was the most important factor. After 6 weeks of acclimatisation, 97% of survival was obtained. At a later stage two techniques were studied for conservation of *T. major* germplasm, the cryopreservation of seeds and cryopreservation of shoot tips, which were studied in three different methods, the vitrification, the droplet-vitrification and the encapsulation-dehydration. The encapsulation-dehydration showed to be the most effective method, in which 67% of the cryopreserved apices formed shoots.

Seeds germinated *in vitro* were used to establish cultures of *P. algarbiensis* and from the shoots obtained leaf explants were isolated and used to study the production of shoots via organogenesis. The best results in terms of shoot formation were obtained in MS medium supplemented with 4 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ IAA.

This work demonstrates that the *in vitro* conservation techniques could be used with success for the conservation of the species *T. major* and *P. algarbiensis*.

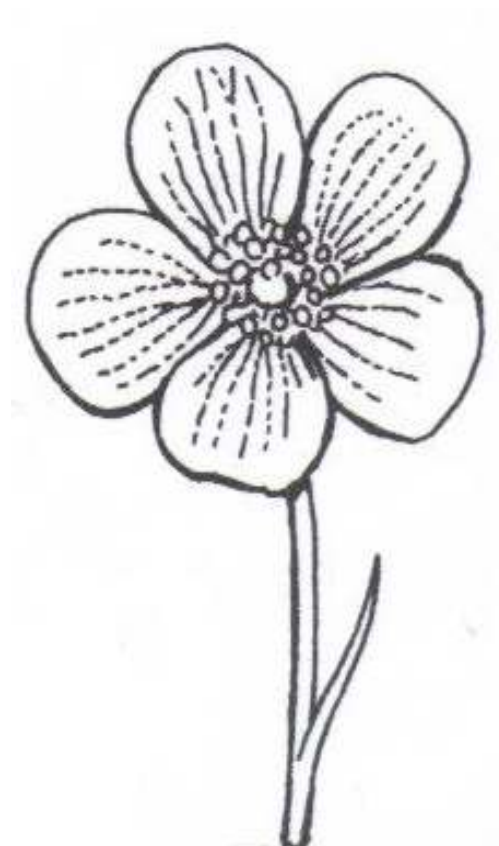
Key-words: Conservation; endangered species; *in vitro* germination; micropropagation; organogenesis; *in vitro* cryopreservation.

Índice geral

Agradecimentos	vi
Abreviaturas	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Capítulo I: Introdução geral	1
1.1. A conservação de recursos fitogenéticos e as razões para a escolha das espécies em estudo	2
1.2. Papel da biotecnologia vegetal na conservação.....	3
1.4. Objectivos do trabalho.....	5
2. Capítulo II: <i>Tuberaria major</i>	6
2.1. Introdução.....	7
2.1.1. Propagação <i>in vitro</i>	9
2.1.2. Criopreservação.....	13
2.1.2.1. Criopreservação de sementes.....	14
2.1.2.2. Criopreservação de ápices.....	14
2.1.2.2.1. Vitrificação.....	15
2.1.2.2.2. Vitrificação “droplet”.....	16
2.1.2.2.3. Encapsulamento-desidratação.....	17
2.2. Objectivos.....	17
2.3. Materiais e métodos.....	18
2.3.1. Propagação <i>in vitro</i>	18
2.3.1.1. Material vegetal.....	18
2.3.1.2. Germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	18
2.3.1.3. Multiplicação dos rebentos.....	20
2.3.1.4. Enraizamento dos rebentos.....	20
2.3.1.5. Aclimatização das plântulas.....	20
2.3.2. Criopreservação.....	21
2.3.2.1. Criopreservação de sementes.....	21
2.3.2.2. Criopreservação de ápices.....	22
2.3.2.2.1. Material vegetal e pré-tratamentos.....	22
2.3.2.2.2. Vitrificação.....	23
2.3.2.2.3. Vitrificação “droplet”.....	24
2.3.2.2.4. Encapsulamento-desidratação.....	25

2.3.3. Meios de cultura.....	26
2.3.4. Manipulação do material vegetal.....	27
2.3.5. Análise e tratamento estatístico dos resultados.....	27
2.4. Resultados e discussão.....	27
2.4.1. Propagação <i>in vitro</i>	27
2.4.1.1. Germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	27
2.4.1.2. Multiplicação dos rebentos.....	30
2.4.1.3. Enraizamento dos rebentos.....	35
2.4.1.4. Aclimatização das plântulas.....	37
2.4.2. Criopreservação.....	39
2.4.2.1. Criopreservação de sementes.....	39
2.4.2.2. Criopreservação de ápices.....	42
2.4.2.2.1. Vitrificação.....	42
2.4.2.2.2. Vitrificação “droplet”.....	44
2.4.2.2.3. Encapsulamento-desidratação.....	45
2.5. Conclusões.....	47
Estampa 2.1.....	49
Estampa 2.2.....	50
Estampa 2.3.....	51
Estampa 2.4.....	52
3. Capítulo III: <i>Plantago algarbiensis</i>	53
3.1. Introdução.....	54
3.1.1. Multiplicação <i>in vitro</i> via organogénese	56
3.2. Objectivos.....	57
3.3. Materiais e métodos.....	58
3.3.1. Material vegetal.....	58
3.3.2. Germinação e multiplicação dos rebentos.....	58
3.3.3. Organogénese.....	58
3.3.4. Multiplicação dos rebentos provenientes de organogénese.....	59
3.4. Resultados e discussão.....	60
3.5. Conclusões.....	66
Estampa 3.1.....	68
Estampa 3.2.....	69
Estampa 3.3.....	70
Conclusões gerais	71

Referências bibliográficas.....	73
Anexos.....	79



1.1. A conservação de recursos fitogenéticos e as razões para a escolha das espécies em estudo

Com o passar dos anos a população mundial aumentou e as fronteiras agrícolas e urbanas expandiram-se ocupando o habitat natural de numerosas espécies de plantas. Este fenómeno tem causado uma rápida erosão da diversidade genética de espécies de plantas nativas, provocando, em alguns casos, a sua total extinção. Estima-se que mais de 100 000 plantas, que representam um terço do total de plantas existentes no mundo, estão ameaçadas ou em fase de extinção na natureza.

Comparando a extensão reduzida da superfície de Portugal com outros países europeus, torna-se evidente a grande diversidade de património natural, destacando-se o elevado número de endemismos e de espécies relíquia do ponto de vista biogeográfico. Esta diversidade resulta sobretudo da localização geográfica deste território. A região mediterrânica, na qual Portugal está inserido, é considerada um dos 25 “hotspots” existentes no mundo, cuja excepcional concentração de espécies endémicas bem como a acelerada perda de habitats, faz com que se torne prioritária a elaboração de estratégias que assegurem a conservação eficaz das espécies e seus habitats (Catarino *et al.*, 2001). Devido à política europeia da conservação ambiental, Portugal está actualmente empenhado na preservação e manutenção da diversidade biológica.

As influências climáticas atlântica e mediterrânica, que se manifestam em Portugal continental, traduzem-se na coexistência de espécies afins a distintas regiões biogeográficas, enriquecendo-se deste modo o conjunto da flora deste território (Catarino *et al.*, 2001). O Algarve, situado na parte mais meridional de Portugal continental, apesar de banhado pelo oceano Atlântico, insere-se numa vasta área onde predomina o clima mediterrânico. O amplo espectro de condições de pluviosidade e de temperaturas que constituem o padrão climatológico da bacia do Mediterrâneo, com quantidades de chuva que se situam entre 200 e 1500 mm anuais e temperaturas médias que oscilam entre os 4 °C e os 19 °C, faz com que exista nesta região uma diversidade extraordinária de espécies e formações vegetais, algumas das quais únicas no país. Para além dos factores mencionados, há a considerar uma vasta quantidade de microclimas e geomorfologia tão distintas que destacam o Algarve como uma das regiões no país onde ocorre uma das maiores diversidades no que respeita a espécies e comunidades vegetais (Pessoa *et al.*, 2004). Os tipos de solos têm igualmente uma grande influência no que

respeita às formações vegetais das diferentes zonas da região. O barrocal algarvio é um exemplo vivo, sendo possuidor de terrenos calcários, em grande parte provenientes do período Jurássico. São estas condições únicas no contexto europeu que originam a ocorrência de um vasto número de espécies, algumas das quais exclusivas do Algarve, entre as quais *Tuberaria major* e *Plantago algarbiensis*.

As espécies *T. major* e *P. algarbiensis* são endemismos exclusivos do território algarvio, cuja distribuição geográfica muito reduzida se limita à faixa litoral do centro do Algarve. Estas espécies singulares, que constituem um património natural de inquestionável valor, há muito que têm a sua existência perturbada, encontrando-se mesmo em perigo de extinção (Pessoa *et al.*, 2004). Apesar dos maiores núcleos populacionais destas espécies se encontrarem em áreas com estatuto de protecção, incluídas numa área protegida integrada na Rede Nacional de Áreas Protegidas – Parque Natural da Ria Formosa, o elevado grau de ameaça a que estão sujeitos, em particular devido à pressão exercida pela expansão de obras urbanas e industriais, não pode deixar de constituir motivo de preocupação face ao reduzido número de populações actualmente existentes. Apesar de ambas as espécies se encontrarem em perigo de extinção, até à data não existem quaisquer registos de trabalhos visando a sua propagação e/ou conservação *ex situ*.

1.2. Papel da biotecnologia vegetal na conservação

A biotecnologia vegetal tem avançado tão rapidamente que por vezes os investigadores de áreas específicas têm dificuldade em avaliar o papel das novas técnicas. Deste modo, as equipas de conservação do presente e do futuro deverão ser compostas por investigadores de diversas áreas. Existem actualmente quatro principais áreas da biotecnologia vegetal que podem auxiliar os programas de conservação de plantas: tecnologia de marcadores moleculares, diagnósticos moleculares, cultura de tecidos e criopreservação. Para além disso, as tecnologias de informação em consonância com a biotecnologia vegetal, têm cada vez mais importância, facilitando os programas de conservação (Ravichandran & Manimekalai, 2005).

Com o aumento do número de espécies em risco de extinção, tornou-se urgente a implementação de técnicas de conservação. Existem duas estratégias básicas de conservação: conservação *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* refere-se à manutenção

das espécies seleccionadas no seu habitat natural em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas. No entanto, a ameaça existente nos habitats naturais de algumas espécies de plantas endémicas cria a necessidade de recorrer muitas vezes à conservação *ex situ* (González-Benito & Pérez, 1994). A conservação *ex situ* é a conservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, através de banco de genes, armazenamento de sementes e colecções *in vitro* em condições normais e limitadas de crescimento, ou criopreservação (Demeulemeester *et al.*, 1992).

A propagação *in vitro* ou micropropagação, a partir de sementes é a via mais comum de conservação *ex situ*, por manter a variabilidade genética. A micropropagação tem como finalidade aumentar rapidamente o número de indivíduos em espécies com problemas reprodutivos e/ou com populações extremamente pequenas. Após a germinação de sementes, os germinantes resultantes são expostos a condições físicas e químicas, apropriadas para cada espécie em particular, de modo a aumentar o número de plantas viáveis num curto espaço de tempo. Deste modo, o estabelecimento de um protocolo de micropropagação é essencial para espécies em vias de extinção, pois é uma alternativa para aumentar rapidamente o número de plantas, comparativamente com os métodos de propagação convencionais, e posteriormente proceder ao reforço das populações naturais através da re-introdução das plantas produzidas *ex situ*.

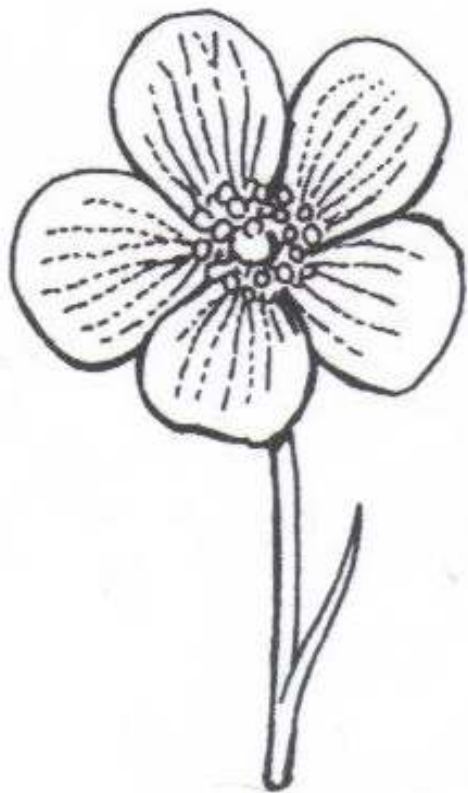
Numa fase posterior à propagação *in vitro* de rebentos, pode utilizar-se a conservação dos recursos genéticos vegetais ou criopreservação que visa a conservação de germoplasma a longo prazo a baixas temperaturas (-196 °C). A criopreservação de sementes é o método mais utilizado devido à simplicidade do seu armazenamento. No entanto, torna-se necessário criar alternativas, especialmente quando se trata de espécies em vias de extinção, pois o número de sementes disponíveis é reduzido. Como alternativa surge por exemplo a criopreservação de ápices.

Com o uso destas técnicas, uma grande quantidade de plantas pode ser produzida num curto espaço de tempo, a partir de uma quantidade mínima de material vegetal, e sobretudo com o mínimo impacto na população nativa.

1.3. Objectivos do trabalho

A riqueza e características únicas da região algarvia contribuem para a existência de espécies exclusivas, consideradas de interesse comunitário prioritário. As espécies *P. algarbiensis* e *T. major* são dois exemplos de plantas ameaçadas de extinção, tornando-se urgente a implementação de estratégias que visem a sua conservação. Apesar do seu interesse, pouco ou nada foi estudado acerca destas espécies, tornando-se relevante a contribuição para o desenvolvimento de um plano de conservação *ex situ*, recorrendo a métodos biotecnológicos. Assim, os objectivos específicos propostos para este trabalho foram:

- i) desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* para a espécie *T. major*, a partir da germinação de sementes, com vista à produção em massa de plantas para utilizar em estratégias de conservação, nomeadamente, na restauração de populações naturais;
- ii) estudar os métodos mais apropriados para a conservação a longo prazo de germoplasma de *T. major*, recorrendo à criopreservação de sementes e de ápices;
- iii) estabelecer um protocolo para a produção rápida e em larga escala de rebentos de *P. algarviensis*, via organogénese, utilizando fragmentos de folhas provenientes de rebentos a crescer *in vitro*.



2.1. Introdução

Tuberaria major (Willk) P. Silva & Rozeira é uma espécie vulgarmente conhecida por Alcar-do-Algarve, e está integrada na família Cistaceae. *T. major* é igualmente designada por *Xolantha globulariifolia* (Willk) Pinto-Gomes. A actual classificação taxonómica desta espécie é a apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Actual classificação taxonómica de *T. major*.

Reino	Plantae
Subespécie	Dilleniidae
Ordem	Violales
Família	Cistaceae
Género	<i>Tuberaria</i>
Espécie	<i>Tuberaria major</i>

A família Cistaceae é constituída por 8 géneros e 200 espécies, das quais 43 (21%) se encontram em perigo de extinção. Estas plantas são normalmente encontradas em habitats secos e ensolarados e apresentam-se essencialmente em forma de arbustos de tamanho pequeno ou médio podendo atingir os 40 cm de comprimento. *T. major* é descrita como um hemicriptófito raríssimo, com toça lenhosa ramificada (Estampa 2.1A). A floração e frutificação ocorrem de Março a Maio (Estampa 2.1B, D). As suas folhas encontram-se dispostas na base do caule e as flores são amarelas e apresentam-se em cimeiras terminais. Ocorrem em solos arenosos ou cascalhentos ácidos, e respondem favoravelmente a fogos, atingindo densidades invulgares em situações pós-fogo, mesmo em locais onde era escassa (Estampa 2.1C).

O número de indivíduos existentes nesta espécie encontram-se distribuídos por alguns núcleos populacionais, principalmente localizados no sotavento algarvio (Figura 2.1)



* - Núcleos de *T. major*

Figura 2.1. Distribuição geográfica das populações de *T. major* na região do Algarve.

A espécie de *T. major* é um endemismo exclusivo do território algarvio, classificado como “Em Perigo Crítico”, cuja distribuição geográfica se encontra muito reduzida. De acordo com estimativas populacionais efectuadas recentemente (ICN, 2006), o número total de exemplares está estimado em 10 000 indivíduos, distribuídos por 12 núcleos, nos concelhos de Albufeira (Tunes e Olhos de Água), Loulé (Quarteira, Ancão, Quinta do Lago e Pontal), Faro (Brejo e Pontal) e Olhão (Belmonte). Os núcleos desta espécie conhecidos actualmente apresentam, à excepção dos da área do Pontal e do Ancão, pequeno número de indivíduos, os quais ocupam áreas bastante pequenas (inferiores a 0,5 ha). Parte da área de distribuição está incluída no Parque Natural da Ria Formosa e no Sítio de Interesse Comunitário (SIC) do Barrocal (ICN, 2006).

A crescente pressão urbano-turística, com destruição e/ou fragmentação do habitat, constitui o principal factor de ameaça, encontrando-se a generalidade dos núcleos populacionais em locais onde existem projectos de urbanização. A deposição de lixo nas suas áreas de ocupação é outro dos factores apontados para o desaparecimento de alguns núcleos.

Face ao escasso número de indivíduos existentes, esta espécie encontra-se actualmente protegida a nível europeu, quer pela Convenção de Berna, relativa à Conservação da Vida Selvagem e do Meio Natural na Europa – Anexo I, quer pela Directiva Habitats (92/43/CEE) – Anexos II e IV e nacional (Decreto-Lei n.º 140/99, alterado pelo Decreto-Lei n.º 49/2005). Segundo a Directiva Habitats, apresenta um estatuto de

espécie prioritária para a conservação, o que obriga o estado-membro em causa a tomar medidas com vista à sua protecção efectiva.

2.1.1. Propagação *in vitro*

A propagação das espécies vegetais pode ser efectuada por duas vias: a vegetativa, em que as plantas são propagadas assexuadamente formando clones, e a seminal, em que a propagação é efectuada mediante mecanismos de reprodução sexuada, passando pela germinação de sementes. Segundo Sigüero (1991), a propagação vegetativa pelas vias tradicionais é muito difícil na maioria das espécies da família Cistaceae. A micropropagação surge assim como alternativa para este tipo de casos.

Um dos princípios que fundamenta a manipulação *in vitro* é a totipotência celular, que é definida como o potencial genético que a célula possui em reproduzir uma planta completa com possível capacidade de regenerar novos tecidos.

A cultura de tecidos é o termo empregado para referir o crescimento de plantas ou partes da planta em condições estéreis. Deste modo, a micropropagação é um método de propagação de plantas em condições assépticas. A regeneração de plantas pode efectuar-se por diferentes vias, nomeadamente, de embriões, células, protoplastos, órgãos, calli, entre outros (Hameed *et al.*, 2006). Consiste, essencialmente, em isolar uma parte da planta (explantado) e proporcionar, artificialmente, as condições físicas e químicas necessárias às células, de forma a que estas expressem o seu poder intrínseco ou induzido. A adopção de procedimentos em condições de assepsia para evitar as contaminações microbianas é sempre necessário. Este método pode ser desenvolvido a partir de sistemas de alongamento de gemas apicais e/ou axilares, organogénese e por embriogénese somática.

Como sistema de propagação, este método apresenta diversas vantagens, tais como: a propagação em massa de clones específicos; o crescimento destas plantas é mais rápido do que as plantas produzidas através de métodos convencionais; a multiplicação de plantas que não produzam sementes ou que apenas produzam em quantidades muito pequenas; o risco de contaminação é muito reduzido; necessidade de uma área de cultura e armazenamento reduzida; as culturas podem ser mantidas durante longos períodos de tempo e permite o controlo das condições de cultura.

Embora a micropropagação proporcione muitas vantagens à propagação de plantas existem limitações relativamente ao seu uso, tais como, o aparecimento de alterações genéticas com o aumento do número de subculturas; fraca capacidade de regeneração; baixas taxas de multiplicação; hiperidricidade; dificuldade na indução de enraizamento nos rebentos; elevada mortalidade das plântulas produzidas *in vitro* na fase de aclimatização.

A micropropagação difere do processo tradicional de propagação na medida em que os componentes biológicos de cada procedimento estão separados por fases para proporcionar um nível de controlo elevado sobre cada um dos aspectos relativos à regeneração e desenvolvimento do processo. Consequentemente, cada passo da sequência pode ser manipulado ou programado, seleccionando os explantados e controlando o ambiente de cultura.

Em 1974 Murashige propunha pela primeira vez a divisão do processo de micropropagação em 3 fases: Fase 1 – Estabelecimento de culturas assépticas; Fase 2: Multiplicação das culturas; Fase 3: Preparação para o restabelecimento das plântulas no solo. Mais tarde, em 1981 Debergh & Maene separaram o processo em 5 fases: Fase 0 – Preparação da planta-mãe; Fase 1 – Iniciação e estabelecimento das culturas; Fase 2 – Multiplicação das culturas; Fase 3 – Alongamento e formação de raízes nos rebentos; Fase 4 – Aclimatização das plântulas produzidas *in vitro*.

A **fase 0** foi introduzida como uma resposta aos problemas de contaminação. O material vegetal é desinfectado, proporcionando um aumento da taxa de sobrevivência por evitar a contaminação por fungos e bactérias (Debergh & Maene, 1981). Esta fase envolve todas as manipulações do material vegetal desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*. Após esta fase segue-se a **fase 1** na qual as culturas são iniciadas e estabelecidas *in vitro*. Os explantados são mantidos em condições assépticas de cultura para prevenir as contaminações e em ambiente controlado (temperatura, humidade relativa e luz) de modo a promover a produção de rebentos. Nesta fase assegura-se um número aceitável de explantados com viabilidade de crescimento. O tipo de explantado, a idade da planta-mãe, o tamanho e altura do ano em que foi recolhido e o estado de desenvolvimento do explantado são factores que têm um peso importante nesta fase (George & Sherrington, 1984).

Prosseguindo as fases do processo, sucede-se a **fase 2** que tem como principais objectivos a multiplicação propriamente dita dos órgãos e estruturas capazes de dar origem a plantas completas e o aumento do número de rebentos em quantidade suficiente para posterior enraizamento. Para tal, recorre-se a reguladores de crescimento, especialmente as citocininas, usadas para estimular a multiplicação de rebentos. Embora o uso destes fitorreguladores possa promover a multiplicação rápida do número de rebentos, em alguns casos, pode inibir o alongamento dos mesmos. Dependendo da espécie e do tipo de explantado, selecciona-se a citocinina e a concentração mais adequada de modo a obter a taxa de multiplicação mais elevada. Para o sucesso desta fase há igualmente que ter em conta outros factores, tais como, factores físicos e ambientais (luz, fotoperíodo e temperatura), constituição do meio de cultura e idade e condições fisiológicas dos tecidos vegetais (Pierik, 1987).

A **fase 3** tem como base a indução da formação de raízes adventícias, sendo as auxinas as principais responsáveis para que tal aconteça. O ácido indol 3-butírico (IBA), o ácido α -naftaleno 1-acético (NAA) e o ácido indol 3-acético (IAA) são as auxinas mais utilizadas para suplementar o meio de basal (Gaspar & Coumans, 1987). O enraizamento pode ser feito *in vitro* ou *ex vitro*. No que diz respeito ao enraizamento *in vitro*, este pode ser efectuado inoculando os rebentos em meios suplementados com uma auxina ou em alternativa efectuar uma imersão em solução de auxina concentrada, seguida de cultura em meio sem reguladores de crescimento. No método *ex vitro*, o enraizamento é feito directamente no substrato de aclimatização, após imersão rápida em solução de auxina concentrada. O tipo de auxina, a sua concentração, o modo de aplicação e duração da exposição podem influenciar os resultados do enraizamento. A redução da concentração de sais no meio é frequentemente referida como benéfica para o enraizamento *in vitro* (Cunha-Lopes *et al.*, 2001). Nesta fase podem surgir alguns problemas como a baixa taxa de enraizamento e a formação de raízes não funcionais (Pierik, 1987).

A **fase 4** é a aclimatização das plântulas produzidas *in vitro*, sendo esta uma das fases mais sensíveis da micropropagação. Nesta fase as plântulas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente em que são progressivamente sujeitas às condições ambientais naturais, de forma a evitar a possibilidade de stress, que provoca danos à planta podendo muitas vezes levar à sua morte (Carvalho *et al.*, 1999).

Durante a cultura *in vitro*, as plântulas estão sujeitas a condições especiais, tais como humidade relativa elevada e densidade de fluxo de fotões mais baixa que na cultura convencional. Por outro lado, o uso de recipientes fechados para evitar contaminações diminui a turbulência do ar, limitando a entrada de CO₂ e a saída dos produtos gasosos produzidos pelas plântulas. Igualmente o facto de as culturas se desenvolverem em meios de cultura contendo hidratos de carbono e fontes de energia, diminui consideravelmente o potencial hídrico do meio e aumenta o risco de contaminações de fungos e bactérias. Também as elevadas concentrações de reguladores de crescimento existentes nos meios de cultura contribuem para a formação de plântulas com anomalias morfológicas, anatómicas e fisiológica (Pospisilova *et al.*, 1999). Todas estas condições tornam as plântulas produzidas *in vitro* muito sensíveis ao transplante para condições *ex vitro*. Como anomalias destacam-se a morfologia anormal das folhas, a baixa actividade fotossintética, fraco controlo da perda de água pelas folhas e deficiente tomada de água pelas raízes. Durante esta fase de transição, as plantas reajustam e readquirem processos fisiológicos que lhes permitem a passagem das condições heterotróficas para condições de autotrofia e desenvolvem adaptações anatómicas e fisiológicas às novas condições de cultura. A selecção do substrato de aclimatização é fundamental devido ao papel importante que desempenha no crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas, podendo influenciar directamente no sucesso da aclimatização (Couto *et al.*, 2003). A formação de um sistema radicular bem desenvolvido durante a fase de enraizamento é igualmente essencial para a sobrevivência das plântulas (Gonçalves *et al.*, 1998).

Quando se pretende reforçar populações vegetais naturais, a utilização da micropropagação é uma via válida para reduzir o risco de extinção de espécies ou populações ameaçadas. A propagação *in vitro* a partir de sementes é a via preferencial uma vez que a diversidade genética é maximizada (Fay, 1992). Ainda assim, cada espécie tem requisitos específicos no que diz respeito à germinação de sementes, especialmente espécies raras e/ou endémicas em que as sementes são difíceis de obter. Embora as sementes estejam expostas a condições controladas de cultura, existem sementes, que embora viáveis apresentam dificuldades em germinar. Estas sementes são denominadas de dormentes, as quais requerem tratamentos específicos para induzir a germinação. As sementes da família Cistaceae não conseguem germinar sem sofrerem algum tipo de pré-tratamento, sendo essenciais estratégias para induzir a quebra de

dormência das sementes. Como a principal causa de dormência das Cistaceae é a dureza do tegumento, os tratamentos com calor ajudam a libertar estas sementes da dormência, quebrando o tegumento impermeável, podendo a germinação prosseguir (Pérez-García & González-Benito, 2005).

Existem alguns estudos relativos à propagação *in vitro* de espécies pertencentes à família Cistaceae (Mkada *et al.*, 1991; Morte & Honrubia, 1992; Iriondo *et al.*, 1995; Zygomala *et al.*, 2003), no entanto, não existe nenhum estudo efectuado para a espécie *T. major*.

2.1.2. Criopreservação

Com o desenvolvimento dos métodos biotecnológicos, aumentou o interesse na gestão dos recursos genéticos vegetais com atributos únicos e surgiram novas ferramentas para a conservação de plantas raras e ameaçadas.

A criopreservação é sem dúvida a técnica mais promissora para a preservação *in vitro* de germoplasma vegetal a longo prazo, sem perda das suas capacidades específicas, podendo no futuro fornecer material vegetal para a produção de plantas visando o reforço de populações naturais. São vários os tipos de material vegetal possíveis de conservar, nomeadamente, sementes, pólen, embriões, suspensões celulares e explantados de cultura *in vitro*. Quando são sujeitas às condições de armazenamento em azoto líquido (-196 °C), as células suspendem todas as reacções químicas, a célula não se divide, sendo evitada a degeneração da mesma.

Como vantagens deste método podemos destacar:

- Aplicabilidade a uma grande diversidade de genótipos;
- Desenvolvimento de uma tecnologia económica e simples com reduzida mão-de-obra;
- Evita um subcultivo regular;
- Mantém a estabilidade genética do material conservado;
- Permite a posterior propagação em grande escala.

2.1.2.1. Criopreservação de sementes

Nos bancos de sementes convencionais as sementes desidratadas (com aproximadamente 5% de humidade) eram armazenadas durante décadas a -20 °C. Presentemente e normalmente em paralelo com este tipo de conservação usa-se o método de criopreservação de sementes, bastante utilizado devido à simplicidade de armazenamento e às reduzidas necessidades em termos de espaço de armazenamento requerido. Existem evidências para diversas espécies de que a criopreservação em azoto líquido (LN) não afecta negativamente a germinação das sementes (González-Benito *et al.*, 1998; Pérez-Garcia & González-Benito, 2008) permitindo a sua conservação por períodos longos ou mesmo ilimitados. Como já foi referido, quando o objectivo é a conservação as sementes são o material preferencial para estabelecer *in vitro* e propagar plantas, visto que a variabilidade genética é maximizada. Assim, a criopreservação de sementes é uma técnica interessante a incluir numa estratégia de conservação, garantindo sempre que necessários a sua utilização para a propagação *in vitro* em larga escala da espécie conservada.

2.1.2.2. Criopreservação de ápices

Apesar das sementes serem o material mais usado para a conservação devido à simplicidade do método de armazenamento, em algumas espécies as sementes são produzidas em quantidades muito reduzidas, podendo também as populações da espécie em questão serem pouco numerosas (González-Benito & Pérez, 1994). A criopreservação de germoplasma vegetal de plantas micropropagadas pode ser uma alternativa viável para estes casos. O ápice das plantas é considerado o material ideal a ser usado neste tipo de criopreservação, pois, embora apresente um tamanho reduzido, tem um alto potencial de tolerância osmótica, que é favorável para uma criopreservação bem sucedida (Gagliardi *et al.*, 2003).

Todos os procedimentos de criopreservação de germoplasma vegetal desenvolvidos têm um passo em comum, a desidratação. Na desidratação a maior parte da água contida na célula passível de congelar é removida através de uma solução vitrificante altamente concentrada (PVS2) ou mediante secagem por exposição ao ar. Este passo reduz ou evita a formação intracelular de cristais de gelo durante a fase de congelamento, caso contrário seria letal para a célula (Reinhoud *et al.*, 1995). No entanto, a desidratação

excessiva pode causar danos na membrana da célula, devido a altas concentrações internas dos solutos, e desnaturação de proteínas. As técnicas de criopreservação foram desenvolvidas para minimizar este tipo de danos que podem ocorrer.

Como método clássico surge o congelamento controlado, baseado em crioproteção química e congelamento lento, seguido de rápida imersão em azoto líquido. Este método é designado por congelamento controlado, congelamento lento ou congelamento em duas etapas. Alguns investigadores têm vindo a usar este método com êxito em *callus* e cultura de células (Schrijnemakers & Van Iren, 1995). Nos últimos dez anos novas técnicas de criopreservação têm sido desenvolvidas, nomeadamente a vitrificação e o encapsulamento-desidratação. Posteriormente alguns investigadores testaram novas técnicas, testando procedimentos derivados ou combinações das técnicas referidas anteriormente, surgindo a vitrificação “droplet” e encapsulamento-vitrificação (Matsumoto *et al.*, 1995, Hirai *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2000).

No presente trabalho foram testadas três das técnicas de criopreservação de ápices existentes: vitrificação, vitrificação “droplet” e encapsulamento-desidratação.

2.1.2.2.1. Vitrificação

No método de vitrificação os explantados são desidratados mediante imersão em solução vitrificante concentrada antes de serem rapidamente imersos em LN. Consequentemente, a solução líquida intracelular consegue solidificar após o congelamento em LN, sem a formação de cristais de gelo. Contudo, a pressão osmótica elevada e a toxicidade da solução vitrificante apresentam-se como limitações desta técnica (Sakai & Engelmann, 2007)

Os primeiros artigos acerca do uso de soluções vitrificantes surgiram no ano de 1989 (Langis *et al.*, 1989; Uragami *et al.*, 1989). Desde então muitas soluções vitrificantes foram desenvolvidas por várias equipas de investigação, contudo a solução mais usada é designada por solução PVS2 (“Plant Vitrification Solution nº 2”), sendo constituída por meio MS suplementado com 0.4 M sacarose, 30% (v/v) glicerol, 15% (v/v) etilenoglicol e 15% (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO). Neste método a solução vitrificante desidrata suficientemente os ápices de modo a vitrificarem durante o congelamento rápido em LN. Deste modo, a chave para o sucesso da criopreservação através da vitrificação está em quantificar o tempo ideal de tolerância da exposição das amostras à solução

vitrificante. O aumento da tolerância à solução vitrificante pode ser conseguido através de pré-condições de cultura e de tratamentos “loading”. Como pré-condições de cultura existem duas possibilidades, aclimatização a frio e cultura em meio rico em açúcares, podendo as amostras ser submetidas a um destes pré-tratamentos ou a ambos.

Para muitas espécies a pré-cultura em meio rico em sacarose parece não ser suficientemente eficiente para aumentar a tolerância à solução vitrificante. Para muitas outras espécies, a exposição directa à solução vitrificante concentrada pode ser tóxica. Torna-se assim necessário tratar as amostras com uma solução que as prepare para a exposição à solução vitrificante, sendo denominada por solução crioprotectora ou solução “loading”. Entre as várias soluções “loading” testadas, a solução contendo meio MS suplementado com 0,4 M sacarose e 2 M glicerol demonstrou ser bastante efectiva na indução de tolerância à fase de desidratação (Sakai & Engelmann, 2007). Após congelamento em LN, as amostras são novamente enriquecidas pelo meio com altos níveis de açúcar (solução “unloading”), de modo a aumentar as percentagens de sobrevivência (Sakai & Engelmann, 2007). Os tratamentos com açúcares podem resultar em alterações na proteína e na composição da membrana, influenciando a flexibilidade e a permeabilidade.

Hoje em dia a vitrificação é de longe o procedimento mais utilizado para criopreservação, devido à facilidade do seu protocolo, altas percentagens de sobrevivência e pelo sucesso da sua aplicação a uma larga variedade de espécies.

2.1.2.2.2. Vitrificação “droplet”

O método de vitrificação “droplet” deriva do anterior método (vitrificação) e foi utilizado pela primeira vez em 1997 por Schäfer-Menuhr (Sant *et al.*, 2008), sendo conhecido por ser um método eficiente numa larga variedade de espécies, permitindo taxas de regeneração mais elevadas, comparativamente aos outros métodos de vitrificação existentes (Sakai & Engelmann, 2007). Neste método, a base do protocolo é exactamente a mesma à utilizada no método de vitrificação, ou seja, utiliza-se um pré-tratamento, solução “loading”, exposição à PVS2 e solução “unloading”. O principal interesse a destacar nesta técnica é a possibilidade de atingir altas taxas de arrefecimento/aquecimento utilizando um pequeno volume de solução vitrificante no qual as amostras estão inseridas. Embora ainda seja uma técnica muito recente e pouco

utilizada, a vitrificação “droplet” é um método promissor dadas as vantagens e resultados que se podem obter (Sakai & Engelmann, 2007).

2.1.2.2.3. Encapsulamento-desidratação

A técnica de encapsulamento-desidratação foi desenvolvida pela primeira vez por Fabre e Dereuddre (1990) em ápices de *Solanum phureja*. Neste procedimento os ápices são encapsulados em cápsulas de alginato de cálcio. A matriz polimérica a circundar o explantado pode promover a sua regeneração após descongelamento. As cápsulas de alginato vão ser utilizadas como “sementes sintéticas”, proporcionando algumas vantagens, entre as quais, a facilidade de armazenamento e de manuseamento, aumento do potencial de armazenamento a longo prazo sem perder viabilidade, as plantas resultantes mantêm a capacidade de formar clones e as cápsulas podem ser colocadas directamente em cultura. Nesta técnica, a resistência à desidratação e ao congelamento é induzida pela pré-cultura dos ápices encapsulados em meio enriquecido com sacarose antes da desidratação. Os açúcares desempenham um papel muito importante no aumento da resistência à desidratação e ao congelamento em LN (Matsumoto *et al.*, 1995). A perda adicional de água é feita por evaporação e subsequente aumento da concentração de sacarose nas cápsulas. A extracção da água que origina uma progressiva desidratação osmótica. Assim, é evitado o uso do DMSO (usado na vitrificação), eliminando a possibilidade de danos pelo efeito tóxico deste composto (Vandenbussche *et al.*, 1993).

2.2. Objectivos

As insistentes ameaças que resultam na diminuição do número de populações de *T. major*, tornam necessário promover estratégias de conservação para esta espécie. A produção de plantas *ex situ* via micropropagação e posterior re-introdução nas populações naturais existentes é uma das vias possíveis para o reforço do número de indivíduos nas populações ameaçadas. A criopreservação surge como um complemento, sendo esta a técnica mais promissora para a preservação de germoplasma vegetal a longo prazo. Até à data não existem quaisquer trabalhos realizados com esta espécie. Como tal os objectivos para este capítulo são as seguintes:

- i) germinar *in vitro* sementes de *T. major* e a partir dos germinantes obtidos estabelecer um sistema de micropropagação simples e rápido (multiplicação das culturas, enraizamento dos rebentos e aclimatização das plântulas);
- ii) criopreservar sementes de *T. major*, através da imersão directa em azoto líquido;
- iii) criopreservar ápices provenientes de rebentos cultivados *in vitro*, recorrendo a 3 métodos distintos: vitrificação, vitrificação “droplet” e encapsulamento-desidratação.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Propagação *in vitro*

2.3.1.1. Material vegetal

Como material vegetal para iniciar *in vitro* culturas de *T. major* utilizaram-se sementes maduras recolhidas em 2 populações naturais desta espécie localizadas em Gambelas, Algarve. As sementes, ainda presas dentro da cápsula da planta, foram observadas à lupa de modo a seleccionar as sementes em bom estado para utilizar nos ensaios de germinação (Estampa 2.2A, B). As sementes permaneceram armazenadas em local seco e à temperatura ambiente até serem usadas nos ensaios de germinação.

2.3.1.2. Germinação *in vitro* de sementes

O primeiro passo neste estudo consistiu na desinfecção das sementes de *T. major* com 15% (v/v) de lixívia comercial (contendo 5% de cloro activo) durante 15 min. Posteriormente completou-se a desinfecção com três lavagens com água destilada estéril. Após a desinfecção, testaram-se cinco pré-tratamentos distintos (Tabela 2.2), sendo quatro relacionados com calor, muito utilizado em espécies da família das Cistaceae, e um com frio. Como ensaio controlo utilizaram-se sementes não sujeitas a qualquer pré-tratamento.

Tabela 2.2. Pré-tratamentos aplicados às sementes de *T. major* para indução de germinação *in vitro* em meio 1/4MS.

Pré-tratamento	Descrição
1	Incubação a 100 °C durante 15 min
2	Incubação a 100 °C durante 30 min
3	Incubação a 100 °C durante 60 min
4	Imersão em água fervente durante 1 min
5	Armazenamento a 5 °C durante 1 semana

Após desinfecção e aplicação dos pré-tratamentos, as sementes foram inoculadas em meio 1/4MS (meio MS com os macronutrientes reduzidos para 1/4). Foram inoculadas 5 sementes por tubo de ensaio (15 × 18 cm) contendo 10 ml de meio de cultura. As culturas foram incubadas na câmara de crescimento a 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para cada pré-tratamento foram testadas 3 repetições com 30 sementes cada e durante 8 semanas de cultura avaliou-se a percentagem (%) de germinação (Estampa 2.2 C).

Posteriormente ao estudo dos pré-tratamentos foi iniciado outro ensaio com vista a estabelecer a temperatura, constante ou alternada, mais adequada para a germinação de sementes de *T. major*. Após desinfecção, as sementes foram sujeitas a um pré-tratamento, no qual foram incubadas durante 60 min a 100 °C, visto ter sido verificada a necessidade de calor para um aumento da percentagem de germinação. Seguidamente as sementes foram inoculadas em placas de Petri estéreis (diâmetro = 5,5 cm) contendo água com 1% (v/v) de agar. As caixas de Petri foram colocadas em câmaras de crescimento sob 16 h de fotoperíodo, com uma intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferentes regimes de temperatura constante (15 °C, 20 °C e 25 °C) ou alternada (15/25 °C). Quando se utilizou a temperatura alternada (15/25 °C), a temperatura mais baixa correspondeu a 8 h no escuro. Foram realizadas 2 repetições de 30 sementes por temperatura testada. O período de cultura durou 20 dias e a contagem das sementes germinadas foi efectuada diariamente. Foi igualmente calculado o tempo médio de germinação (TMG) para averiguar se as temperaturas de incubação têm influência no tempo de germinação (dias). Para tal, utilizou-se a Equação 1.

$$TMG(dias) = \frac{\sum n_i \times \sum t_i}{n} \quad (1)$$

Em que:

n_i - número de sementes germinadas (sem acumular o número de sementes germinadas nos dias anteriores);

t_i - dias após a inoculação;

n - número de sementes germinadas no total.

2.3.1.3. Multiplicação dos rebentos

Nos ensaios de multiplicação foram utilizados rebentos provenientes da germinação *in vitro* de sementes os quais foram separados em explantado apical e basal. Foram testadas 3 citocininas em meio MS, zeatina (Zea), cinetina (Kin) e benziladenina (BA) em várias concentrações (0,1; 0,2 e 0,5 mg l⁻¹). Inocularam-se 5 rebentos por balão “Erlenmeyer” de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura. As culturas foram incubadas na câmara de crescimento a 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 50 μmol m⁻² s⁻¹. Foram efectuadas 4 repetições com 10 rebentos por meio (Estampa 2.2 D, E e F). Após 6 semanas de cultura avaliou-se a percentagem de multiplicação (percentagem de rebentos com capacidade multiplicativa), número de rebentos desenvolvidos por cultura e comprimento do maior rebento. Apesar do enraizamento dos rebentos não ser o objectivo desta fase, tendo-se verificado a ocorrência de enraizamento optou-se por avaliar também a percentagem de enraizamento, o número de raízes desenvolvidas por rebento e o comprimento da raiz mais longa.

2.3.1.4. Enraizamento dos rebentos

Nesta fase estudou-se o efeito do meio basal, com a concentração integral de sais (MS) ou a sua redução para metade (1/2MS), das auxinas IBA e NAA nas concentrações de 0,2 e 0,5 mg l⁻¹, no enraizamento *in vitro* de rebentos de *T. major*. Para tal, utilizaram-se rebentos de tamanho idêntico provenientes do final da fase de multiplicação em meio

MS suplementado com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ de Zea. Inocularam-se 6 rebentos por balão “Erlenmeyer” de 500 ml contendo 80 ml meio de cultura. As condições de cultura usadas foram as descritas na fase de multiplicação. Foram efectuadas 5 repetições com 6 rebentos cada (Estampa 2.3A, B e C). Após 6 semanas avaliou-se a percentagem de enraizamento, o número de raízes e o comprimento da maior raiz e a altura do caule.

2.3.1.5. Aclimatização das plântulas

No final da fase de enraizamento as plântulas foram retiradas do meio de cultura e o sistema radicular lavado em água corrente e transferidas individualmente para vasos de plástico com capacidade de 100 cm^3 , contendo substrato composto por uma mistura de turfa e vermiculite 3:1 (v/v). As plântulas foram pulverizadas com água destilada e transferidas para câmara de aclimatização com controlo de luz e humidade relativa. O fotoperíodo foi de 16 h e a intensidade luminosa ao nível das plantas foi regulada para $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na primeira semana de aclimatização e $124 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas restantes semanas (lâmpadas fluorescentes Gro-Lux F18W/GRO). As plantas foram inicialmente divididas em dois grupos, as provenientes de enraizamento em meio MS e as enraizadas em meio 1/2MS. Para cada um dos grupos de plantas testaram-se dois tratamentos distintos de aclimatização, a manutenção das plantas na câmara de aclimatização durante a totalidade do período de aclimatização (6 semanas), ou a sua manutenção durante 2 semanas, seguidas de transferência para caixas de polietileno transparentes onde permaneceram as restantes 4 semanas. Durante a aclimatização, as plantas que estavam dentro das caixas de polietileno foram arejadas e gradualmente expostas a uma humidade relativa mais baixa, através da abertura progressiva das caixas.

As plantas foram regadas semanalmente com solução nutritiva (1 ml/l água), adubo foliar Selkal (Selectis, Setúbal) e de 2 em 2 semanas foi contabilizada a percentagem de sobrevivência, o número de folhas novas e a altura do caule (Estampa 2.3D, F). Após a fase de aclimatização algumas plantas foram transplantadas para o habitat natural em Gambelas, Faro (Estampa 2.3F, G).

2.3.2. Criopreservação

2.3.2.1. Criopreservação de sementes

Para dar início à criopreservação das sementes colocaram-se 25 sementes dentro de um criotubo e imergiu-se em LN (Figura 2.2). O ensaio foi repetido 4 vezes e os criotubos permaneceram durante um mês em LN. Após este período as sementes foram descongeladas à temperatura ambiente, esterilizadas em 6% de hipoclorito de sódio, e metade delas sujeitas a um pré-tratamento que consistiu na incubação a 100 °C durante 60 min. Após este passo, as sementes pré-tratadas e sem pré-tratamento foram inoculadas em placas de Petri estéreis (5,5 cm de diâmetro) contendo água com 1% (p/v) de agar e foram colocadas em câmaras de crescimento a 15 °C ou a 15/25 °C.



Figura 2.2. Contentor de azoto líquido onde foi efectuada a criopreservação de sementes.

O período de cultura durou 20 dias, sendo contabilizado diariamente o número de sementes germinadas.

2.3.2.2. Criopreservação de ápices

2.3.2.2.1. Material vegetal e pré-tratamentos

Para iniciar estes ensaios utilizaram-se rebentos isolados de culturas a crescer *in vitro* em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea. Estas culturas foram estabelecidas *in vitro* a partir da germinação de sementes como descrito na secção 2.3.1. Em condições de assepsia procedeu-se à divisão do rebento em zona apical e segmentos nodais que foram inoculados de novo no meio anteriormente referido, para futuramente servirem de fonte para extracção de ápices (Estampa 2.4B). O meio usado para o alongamento dos

ápices foi o usado para a multiplicação das culturas (MS suplementado com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ Zea), visto tratar-se do melhor meio para crescimento de culturas desta espécie. Após uma semana, os ápices, com aproximadamente 2 mm de comprimento, foram extraídos como demonstra a Figura 2.3. A extracção foi efectuada em câmara de fluxo horizontal, com o auxílio de microscópio óptico, caixas de Petri e bisturis de ponta fina.

Após extracção os ápices foram inoculados em meio MS semi-sólido suplementado com 0.3 M sacarose e foram incubados a 25°C sob baixa intensidade luminosa durante 1 dia (pré-tratamento).

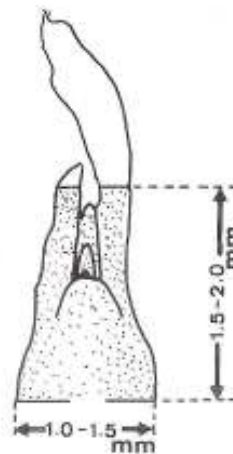


Figura 2.3. Secção longitudinal da excisão de um ápice. Adaptado de: Niino *et al.* (1992).

2.3.2.2.2. Vitrificação

Os ápices pré-tratados (Figura 2.4A) foram colocados dentro de um criotubo de 2 ml e imersos em 1 ml de solução “loading” (meio MS com 0,4 M sacarose e 2 M glicerol) durante 20 min à temperatura ambiente (Figura 2.4B). Após a remoção da solução “loading”, com o auxílio de uma agulha hipodérmica, o criotubo foi introduzido dentro de um recipiente com gelo picado para atingir 0°C . Seguidamente foram adicionados 2 ml de solução PVS2 gelada [30% (v/v) glicerol, 15% (v/v) etilenoglicol e 15% (v/v) DMSO em meio MS suplementado com 0.4 M sacarose], e misturou-se cuidadosamente (Figura 2.4C). Foram testados diferentes períodos de exposição dos ápices à solução PVS2: 0, 30, 60, 90, 120 e 180 min. Findo o tempo de exposição o criotubo que continha os ápices e a solução PVS2 foi imerso directamente em azoto líquido (-196°C) durante 1 h (Figura 2.4D). Imediatamente após terminar o período de congelamento, foi efectuado o descongelamento colocando o criotubo dentro de um frasco com água destilada estéril previamente incubado num banho de água a 40°C (Figura 2.4E).

Durante o descongelamento agitou-se vigorosamente o criotubo durante 1,5 min. Seguidamente, a solução PVS2 foi substituída por 2 ml de solução “unloading” (meio MS com 1,2 M sacarose). A solução foi mantida durante 20 min à temperatura ambiente (Figura 2.4F). Posteriormente, a solução de lavagem “unloading” foi retirada e os ápices foram cultivados em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea (Figura 2.4G). No dia seguinte, os ápices foram transferidos para meio fresco e colocados nas condições normais de crescimento (25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h, 60 µmol m⁻² s⁻¹). Após 4 semanas contabilizou-se a percentagem de rebentos que regenerou. Neste método foram efectuadas 3 repetições com 5 ápices para cada tempo de exposição à PVS2. Inicialmente foi efectuados ensaios sem fase de congelamento de modo a verificar a sensibilidade do material mediante a solução PVS2.

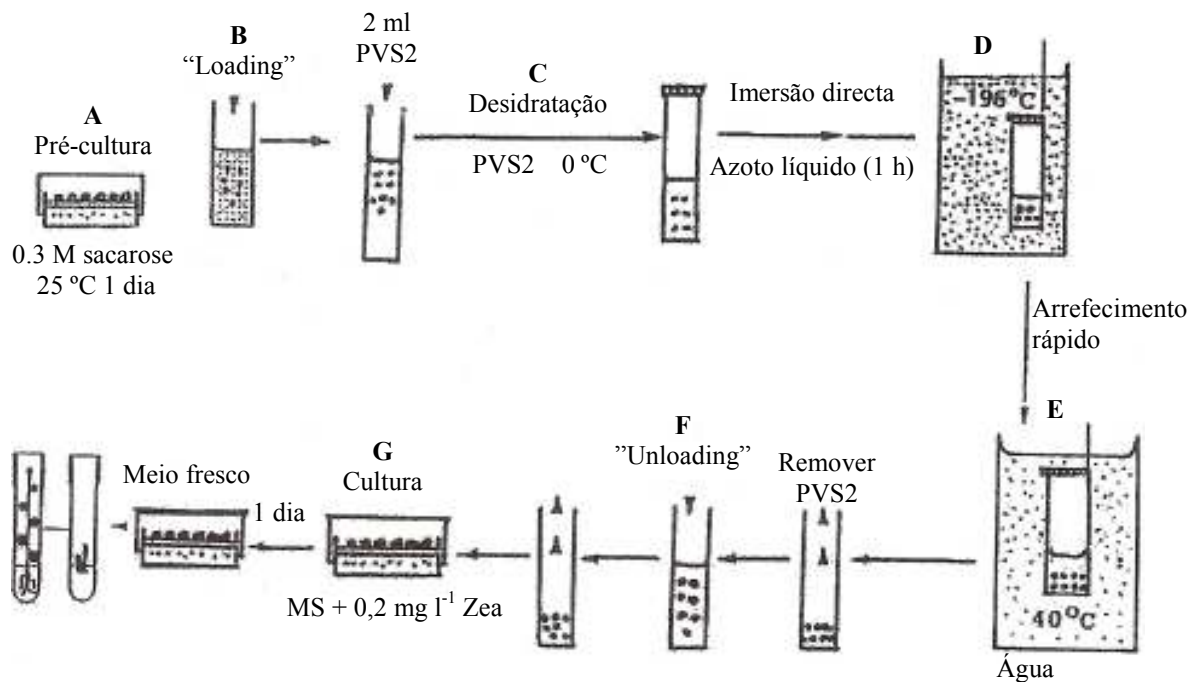


Figura 2.4. Esquema ilustrativo do protocolo de criopreservação de ápices de *T. major* pelo método de vitrificação.

2.3.2.2.3. Vitrificação “droplet”

Este método foi desenvolvido a partir do método de vitrificação, sendo por isso a base relativamente idêntica. Os ápices pré-tratados foram colocados em caixas de Petri estéreis com papel de filtro estéril. Seguidamente, introduziram-se 2 ml de solução “loading” (meio MS com 0,4 M sacarose e 2 M glicerol) durante 20 min à temperatura

ambiente. Passada esta fase, a solução “loading” foi retirada e as caixas de Petri foram inseridas dentro de um recipiente cheio de gelo picado. Atingidos os 0 °C, foram adicionados 2 ml de solução PVS2 gelada [30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) etilenoglicol e 15% (p/v) DMSO em meio MS suplementado com 0.4 M sacarose]. Os tempos de exposição à PVS2 estudados foram os seguintes: 0, 30, 60, 90, 120 e 180 min. Quando o tempo correspondente estava próximo do final, os ápices foram transferidos através de uma gota de solução PVS2 (8 µl) para um tira de papel de alumínio (8 mm – 30 mm) estéril previamente colocada numa caixa de Petri sobre um bloco refrigerante. Em cada tira de alumínio foram colocadas 3 gotas contendo cada uma 1 ápice, que foram depois rapidamente introduzidas dentro do LN. Dentro do recipiente de LN foi colocado previamente um suporte com os criotubos sem tampa necessários para receber, dentro de cada um deles, a tira de papel de alumínio com as gotas. As tiras de papel de alumínio permaneceram dentro do LN durante 10 min. Seguidamente, retiraram-se as tiras de papel de alumínio do LN e transferiram-se para uma caixa de Petri estéril com 3 ml de solução “unloading” (meio MS com 1,2 M sacarose) à temperatura ambiente. Depois de permanecerem 20 min na solução “unloading”, esta foi retirada e os ápices cultivados em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea. No dia seguinte os ápices foram transferidos para meio fresco e colocados em condições normais de crescimento (25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h, 60 µmol m⁻² s⁻¹). Após 4 semanas contabilizou-se a percentagem de rebentos que regenerou. Neste método foram efectuadas 3 repetições com 5 ápices para cada tempo de exposição à PVS2.

2.3.2.2.4. Encapsulamento-desidratação

Os ápices pré-tratados foram inseridos dentro de um copo de precipitação com 250 ml de solução de alginato [meio MS com 0,35 M sacarose e 3% (p/v) alginato] e agitados suavemente. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, pipetou-se cada ápice e libertaram-se gota-a-gota num copo de precipitação com 100 ml de uma solução de cálcio (meio MS com 0,35 M sacarose e 100 mM Ca). As cápsulas formadas permaneceram 20 min dentro da solução de cálcio. As cápsulas foram recuperadas da solução de cálcio com o auxílio de um coador estéril. Seguidamente as cápsulas foram introduzidas numa solução composta por meio MS suplementado com 0,75 M de sacarose e incubaram-se a 25 °C durante 18-20 h com agitação (120 rpm). Passado este período, as cápsulas foram novamente recuperadas da solução de sacarose e depositadas

sobre caixas de Petri com papel de filtro estéril de forma a absorver o líquido excedente. As cápsulas foram de seguida dispostas numa caixa de Petri estéril (15 cápsulas/caixa) de modo a não tocarem umas nas outras e foram desidratadas através do fluxo de ar da câmara de fluxo laminar a 25 °C até 20% de humidade. Foram testados diversos tempos de desidratação: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 h, findo o qual estas foram transferidas para criotubos e estes inseridos dentro de contentores de LN, onde permaneceram pelo menos 1 h. O descongelamento foi efectuado dentro de um frasco com água estéril, previamente colocado num banho de água a 40 °C. Durante o descongelamento de 1,5 min, as cápsulas foram agitadas vigorosamente. As cápsulas foram de seguida colocadas em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea em condições normais de crescimento (25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h, 60 µmol m⁻² s⁻¹). No dia seguinte, as cápsulas foram transferidas para meio fresco (Estampa 2.4 A). Na Figura 2.5 estão resumidas as diversas fases do método de encapsulamento-desidratação. Nestes ensaios efectuaram-se 3 repetições com 5 ápices para cada tempo de desidratação testado.

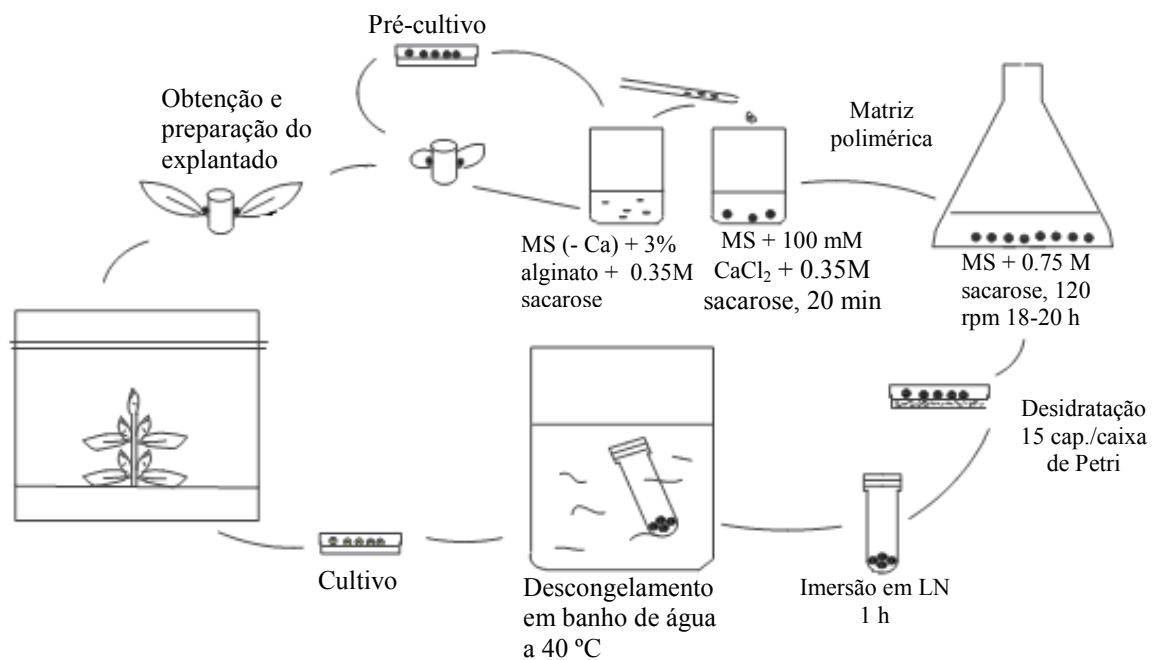


Figura 2.5 Esquema ilustrativo do protocolo de criopreservação de ápices de *T. major* pelo método de encapsulamento-desidratação.

2.3.3. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram preparados a partir de soluções-mãe de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e fonte de ferro. O meio foi suplementado com 20 g l⁻¹ (p/v) de sacarose e 10 g l⁻¹ (p/v) de agar e o pH foi ajustado a 5,75 (com NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 M). A esterilização dos meios de cultura foi efectuada por autoclavagem a 121 °C, 1 atm. durante 20 min.

2.3.4. Manipulação do material vegetal

A manipulação do material vegetal foi efectuada em câmara de fluxo laminar previamente desinfetada com etanol. Em condições de assepsia, os instrumentos de auxílio à manutenção do material vegetal (material de corte e manuseamento) foram esterilizados em esterilizadores de bancada a 250 °C, aproximadamente. Todo o material de vidro (p.e. caixas de Petri) e de plástico (p.e. pontas de micropipetas) foram previamente esterilizados.

2.3.5. Análise e tratamento estatístico dos resultados

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS para Windows versão 15, através de análise de variância. Para valores de F significativos compararam-se as médias pelo teste de Duncan para $P = 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Previamente à análise estatística os dados de percentagens foram alterados para arco seno da raiz quadrada da percentagem/100. Os gráficos foram elaborados no programa Sigma Plot versão 8.

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Propagação *in vitro*

2.4.1.1. Germinação *in vitro* de sementes

Neste trabalho observou-se que, no geral, as sementes que não sofreram qualquer tipo de pré-tratamento, isto é, inoculadas logo após a desinfecção, não germinaram. Este

facto indicia que as sementes de *T. major* são dormentes, resultado este verificado em estudos relativos à família Cistaceae (Corral *et al.*, 1990; Pérez-García, 1997; Pérez-García & Escudero, 1997; González-Benito *et al.*, 1998; Nadal *et al.*, 2002; Pérez-García & González-Benito, 2005; Pérez-García & González-Benito, 2006). A dureza do tegumento e a impermeabilidade à água destas sementes são as causas mais apontadas para a dormência encontrada em várias espécies desta família (Pérez-García & Escudero, 1997).

Analisando os resultados obtidos (Figura 2.6), observou-se que, à semelhança do verificado em outras espécies pertencentes à mesma família (Pérez-García & González-Benito, 2005; Pérez-García & Escudero, 1997; Delgado *et al.*, 2008), os pré-tratamentos com calor são essenciais para obter um aumento significativo da percentagem de germinação de sementes de *T. major*. Verificou-se ainda, não haver diferenças significativas ($P \geq 0,05$) entre as percentagens de germinação de sementes submetidas a diferentes pré-tratamentos de calor, quer fosse calor seco a 100 °C durante 15, 30 ou 60 min, quer fosse água fervente durante 1 min. A percentagem de germinação mais elevada, $54,11 \pm 11,95\%$, foi obtida no pré-tratamento de incubação a 100 °C durante 15 min destacando-se claramente do ensaio controlo ($P < 0,05$), onde se observou apenas $1,96 \pm 0,98\%$ de germinação. Tal como esperado, o pré-tratamento com frio não teve qualquer influência em termos de germinação (Figura 2.6).

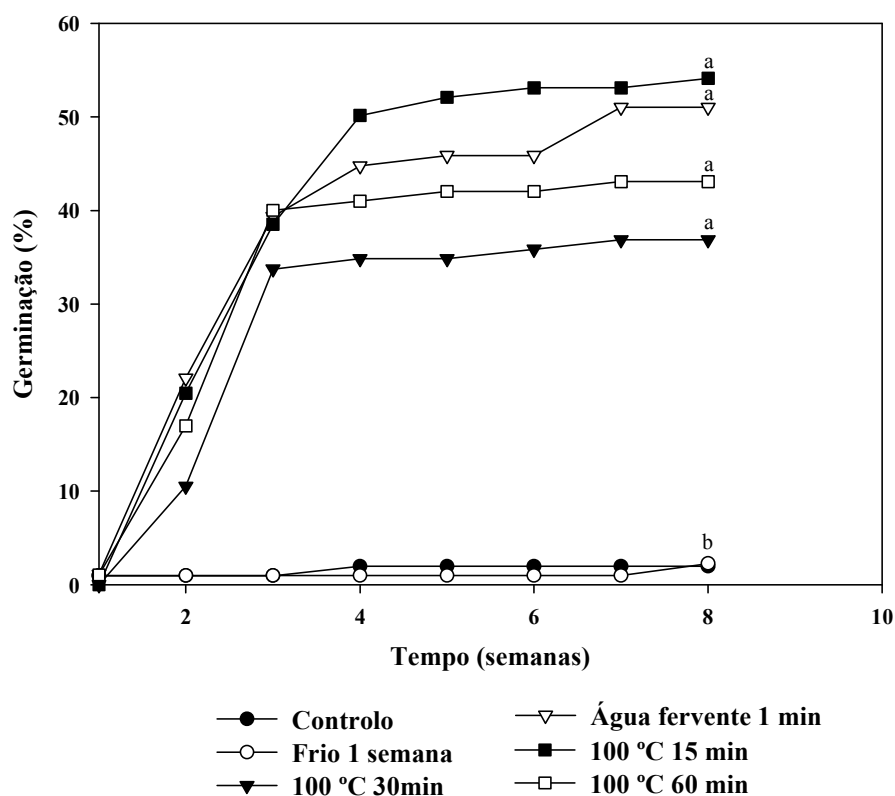


Figura 2.6. Influência de diferentes pré-tratamentos na germinação (%) de sementes de *T. major* inoculadas em meio 1/4MS e incubadas durante 8 semanas a 25 ± 2 °C. Os valores representam médias de 3 repetições de 30 sementes cada. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

De acordo com Nadal *et al.* (2002) o calor e a escarificação libertam as sementes da dormência quebrando a impermeabilidade do tegumento permitindo que a germinação prossiga. O calor gerado pelos incêndios será provavelmente a causa natural mais importante para promover a germinação destas sementes (Pérez-García & Escudero, 1997).

Na Figura 2.7 está representado o efeito das temperaturas de incubação na percentagem de germinação de sementes pré-tratadas (60 min a 100 °C) de *T. major*. Analisando os resultados obtidos, verificou-se que não se obtiveram diferenças significativas entre as temperaturas ($P \geq 0,05$), embora a percentagem de germinação mais elevada, $63,33 \pm 16,67\%$, tenha sido alcançada em sementes incubadas à temperatura alternada (15/25 °C).

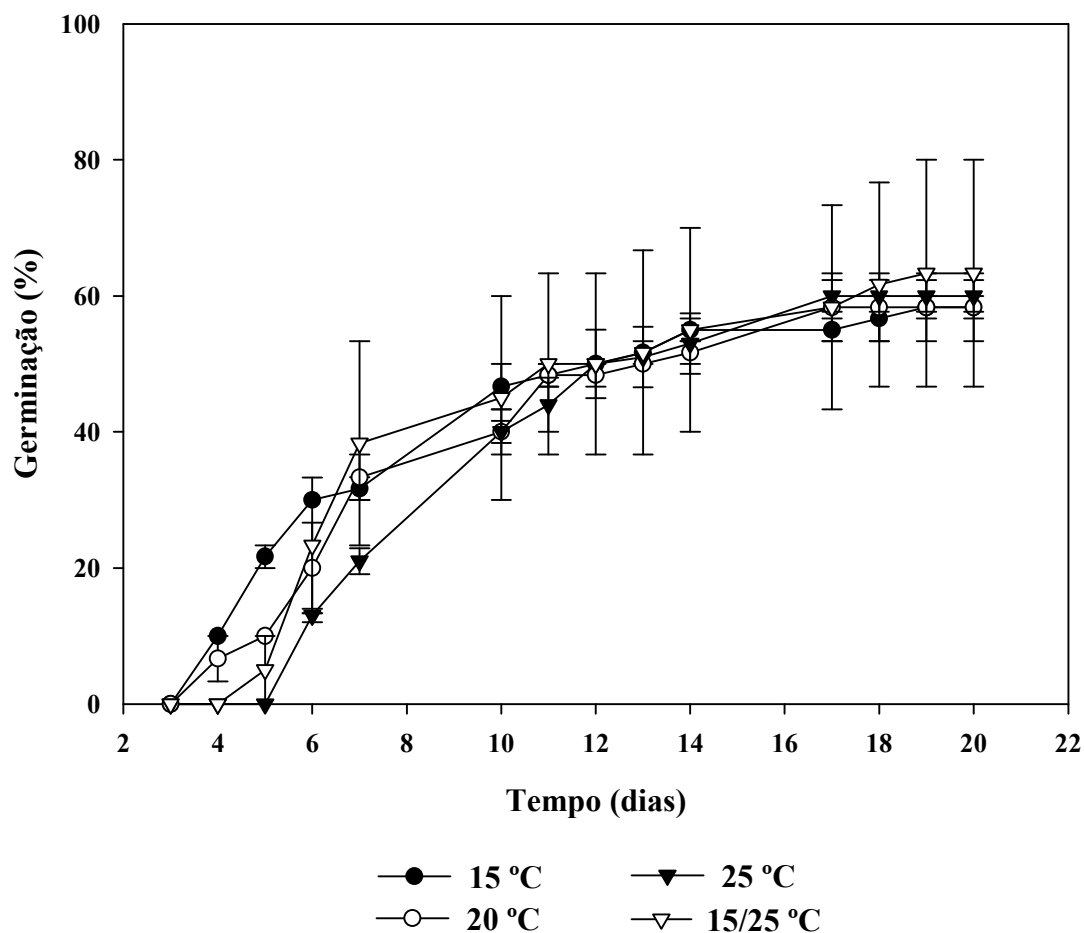


Figura 2.7. Efeito da temperatura de incubação, durante 20 dias, na percentagem de germinação de sementes de *T. major*. Os valores representam médias de 2 repetições de 30 sementes e as barras verticais representam os erros-padrão. Estes resultados não apresentaram diferenças significativas para $P \geq 0,05$.

A possível explicação para não existirem diferenças significativas entre as várias temperaturas de germinação poderá ser devido ao facto de se terem utilizado sementes provenientes de diferentes plantas, o que terá aumentado a variabilidade de resposta entre as várias repetições. O número de repetições efectuadas demonstrou ser insuficiente para serem demonstradas diferenças.

2.4.1.2. Multiplicação dos rebentos

A fase de multiplicação é de grande importância em todo o processo de micropropagação, uma vez que a sua finalidade é a produção rápida e em larga escala do número de rebentos. Para tal, recorre-se geralmente a um meio de cultura suplementado com citocininas (Debergh & Read, 1991). Os rebentos provenientes da

germinação de sementes de *T. major* foram utilizados para induzir a multiplicação *in vitro* em meio MS suplementado com as citocininas Zea, Kin e BA nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,5 mg l⁻¹. Nesta fase estudou-se também a influência do tipo de explantado, testando-se explantados apicais e basais. Analisando os resultados (Figura 2.8) verificou-se que todas as citocininas nas diferentes concentrações induziram a formação de rebentos. Independentemente do tipo de citocinina e da sua concentração, os rebentos basais demonstraram ser o tipo de explantado mais adequado no que diz respeito à percentagem de rebentos com capacidade multiplicativa ($P < 0,001$).

Relativamente aos resultados obtidos com os rebentos apicais, observou-se que os meios suplementados com a citocinina BA (independentemente da concentração) e com a citocinina Zea (exceptuando a concentração de 0,1 mg l⁻¹) induziram a percentagem de multiplicação mais elevada (Figura 2.8), apresentando diferenças significativas ($P < 0,05$). A percentagem mais elevada ($91,94 \pm 2,7\%$) foi obtida no meio suplementado com 0,5 mg l⁻¹ BA. A percentagem de multiplicação obtida com a citocinina Kin não foi significativamente diferente ($P \geq 0,05$) do ensaio controlo ($37,5 \pm 7,78\%$).

Por sua vez, nos rebentos basais a adição de citocininas não aumentou significativamente a percentagem de rebentos com resposta multiplicativa comparativamente com o ensaio controlo ($P \geq 0,05$) (Figura 2.8). Ainda assim, em meios suplementados com as citocininas Zea e BA na concentração mais elevada, obtiveram-se percentagens de resposta mais elevadas (100%). Em meio sem reguladores de crescimento, a percentagem de multiplicação foi superior nos rebentos basais ($94,44 \pm 5,56\%$) em comparação com os rebentos apicais ($37,50 \pm 7,78\%$), demonstrando a maior capacidade multiplicativa deste tipo de explantado.

Relativamente ao número de rebentos desenvolvidos por cada rebento apical inoculado, foi possível verificar que, comparativamente com o ensaio controlo e independentemente da citocinina usada as concentrações mais elevadas inibem a formação de rebentos. O meio suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea foi o que permitiu a produção de maior número de rebentos por cultura ($5,43 \pm 0,59$), embora sem diferenças significativas em relação a alguns meios (Figura 2.8).

No caso dos rebentos basais, os meios suplementados com 0,2 mg l⁻¹ de Zea e BA induziram a formação de maior número de rebentos ($6,83 \pm 0,77$ e $6,55 \pm 0,71$, respectivamente), evidenciando diferenças significativas em relação aos restantes meios.

Para todas as citocininas utilizadas nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg l⁻¹ obtiveram-se resultados semelhantes ou inferiores ao ensaio controlo.

Os rebentos inoculados em meio de cultura suplementado com a citocinina BA multiplicaram em demasia, tornando-se muito difícil isolar e contabilizar todos os rebentos obtidos. Assim, os resultados relativos ao número de rebentos obtidos nestes meios estão subvalorizados. Para além disso, os rebentos originados por este meio a concentrações altas (0,5 mg l⁻¹) apresentavam sintomas de hiperhidricidade, tal como já observado por outros autores durante a multiplicação *in vitro* de diferentes espécies (Cuenca & Amo-Marco, 2000; Vater, 2005). Segundo López *et al.* (2004) a citocinina BA, quando utilizada em concentrações mais baixas (0,25 e 0,15 mg l⁻¹) não provoca este problema nos tecidos.

Os rebentos apicais multiplicados em meio suplementado com 0,5 mg l⁻¹ Zea atingiram o maior comprimento (1,88 ± 0,13 cm), embora este valor não tenha sido significativamente diferente. Relativamente aos rebentos basais, os meios suplementados com 0,5 mg l⁻¹ Zea e 0,2 mg l⁻¹ Kin demonstraram ser os meios mais adequados permitindo obter rebentos com um comprimento mais elevado (1,58 ± 0,13 cm e 1,56 ± 0,14 cm, respectivamente), obtendo diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação aos restantes meios, excepto no meio suplementado com 0,5 mg l⁻¹ Kin. Nos restantes meios não foram observadas diferenças significativas comparativamente ao ensaio controlo.

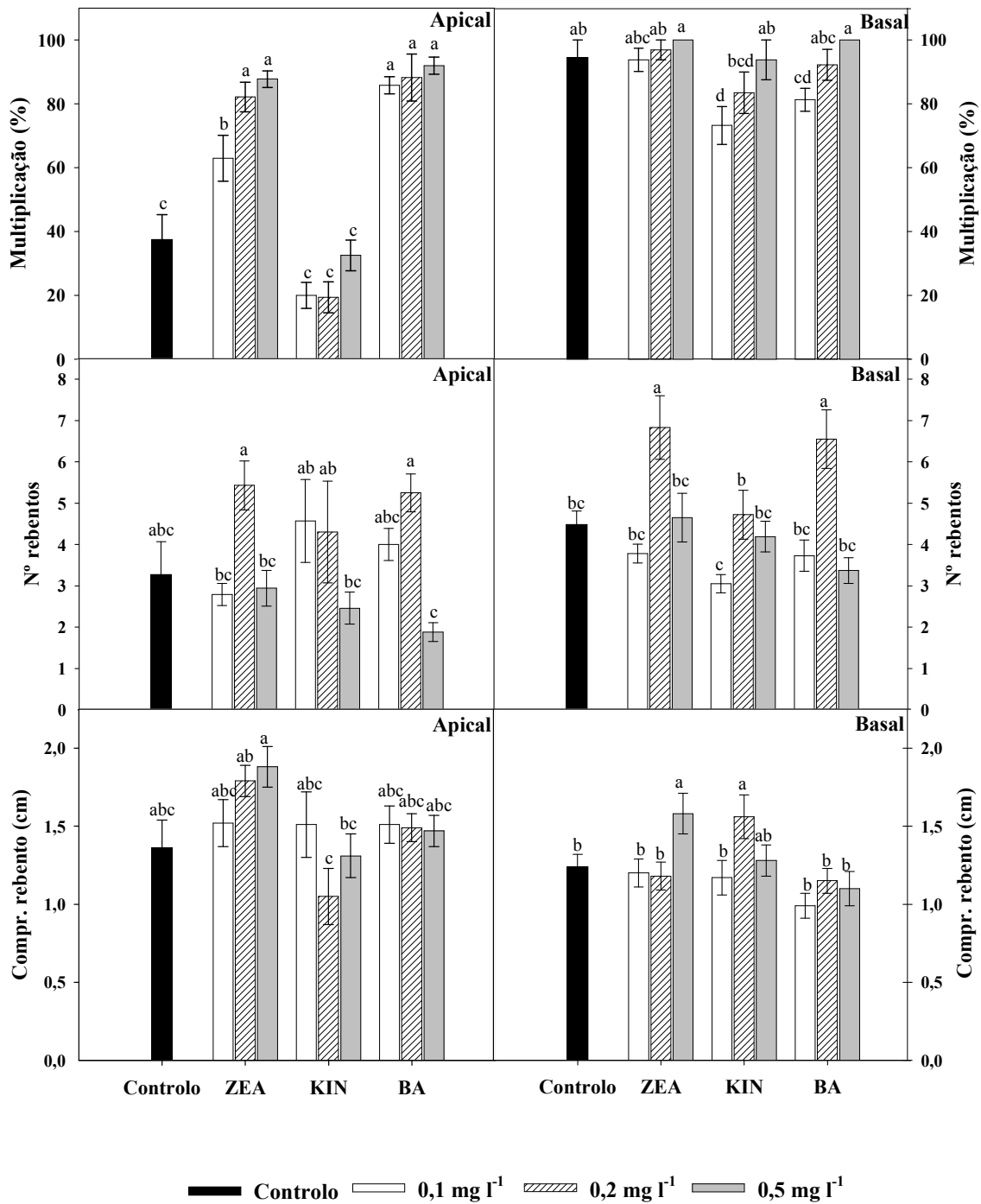


Figura 2.8. Efeito do tipo de explantado (apical e basal), das citocininas (ZEA, KIN e BA) e sua concentração (0,1; 0,2 e 0,5 mg l⁻¹) na percentagem de multiplicação, no número de rebentos desenvolvidos por cada cultura e no comprimento do maior rebento (cm). Os valores representam média e as barras verticais representam os erros-padrão de 4 repetições com 10 rebentos para cada parâmetro testado. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para P < 0,05 (Duncan's New Multiple Range Test).

Analisando em conjunto todos os parâmetros avaliados na fase de multiplicação verificou-se que a cultura de rebentos em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea não só permitiu obter elevadas taxas de multiplicação como os rebentos desenvolvidos eram facilmente isolados e apresentavam aspecto vigoroso e normal. Assim, este é o meio mais adequado para multiplicar *in vitro* rebentos de *T. major*. Estes resultados contrastam com os obtidos para outra espécie pertencente à família Cistaceae, *Helianthemum bystropogophyllum* Svent., em que López *et al.* (2004) obtiveram bons resultados na fase de multiplicação com a citocinina BA, evidenciando o facto de a baixas concentrações (0,25 e 0,15 mg l⁻¹) ser possível reduzir o número de rebentos com aspecto hiperhidratado. No presente trabalho, os rebentos provenientes do meio suplementado com a citocinina BA a concentrações mais baixas (0,1 mg l⁻¹) apresentaram menor percentagem de rebentos hiperhidratados, no entanto a taxa de multiplicação foi igualmente mais reduzida (81,25 ± 3,61%). Segundo Morte & Honrubia (1992) a citocinina Kin demonstrou ser efectiva na fase de multiplicação de rebentos da espécie *Helianthemum almeriense* Pau. No entanto, Iriondo *et al.* (1995) estudaram o método de micropropagação para 6 espécies de *Cistus* (Cistaceae) e concluíram que em todas as espécies estudadas, a citocinina Kin revelou ser pouco eficiente. Pode assim concluir-se que a preferência pelo tipo de citocinina durante a multiplicação *in vitro* não é consensual para diferentes espécies desta família.

Inesperadamente verificou-se o enraizamento dos rebentos durante a fase de multiplicação em todos os meios de cultura testados, atingindo a percentagem de enraizamento mais elevada nos ensaios controlo de rebentos basais e apicais, respectivamente 63 e 66% (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Efeito das citocininas e sua concentração no enraizamento (%), número de raízes desenvolvidas por rebento e comprimento da raiz mais longa (cm) de rebentos de *T. major*.

Citocinina	mg l ⁻¹	Tipo de explantado	Enraizamento (%)	Número de raízes	Compr. da maior raiz (cm)
Controlo	-	Apical	65,63 ± 9,82 a	3,10 ± 0,30 b	2,81 ± 0,15 a
		Basal	63,19 ± 5,68 a	2,62 ± 0,42 a	2,54 ± 0,19 a
Zea	0,1	Apical	16,96 ± 6,42 cd	3,00 ± 0,97 b	1,13 ± 0,15 a
		Basal	11,46 ± 4,55 cd	3,75 ± 1,31 b	1,55 ± 0,10 b
	0,2	Apical	30,36 ± 10,26 bc	2,71 ± 0,46 b	1,64 ± 0,15 a
		Basal	51,34 ± 6,54 ab	3,40 ± 0,52 b	1,81 ± 0,15 ab
	0,5	Apical	17,50 ± 7,5 cd	1,43 ± 0,20 b	1,33 ± 0,27 a
		Basal	32,29 ± 12,77 bcd	2,73 ± 0,38 b	1,77 ± 0,16 ab
Kin	0,1	Apical	47,50 ± 2,50 ab	2,58 ± 0,33 b	1,68 ± 0,17 a
		Basal	46,43 ± 2,06 ab	2,21 ± 0,47 b	2,15 ± 0,12 ab
	0,2	Apical	33,49 ± 8,74 bc	1,94 ± 0,31 b	1,83 ± 0,22 a
		Basal	33,93 ± 9,31 abc	2,30 ± 0,42 b	2,66 ± 0,28 a
	0,5	Apical	30 ± 7,07 bc	2,17 ± 0,61 b	1,63 ± 0,33 a
		Basal	26,04 ± 9,84 bcd	2,22 ± 0,64 b	2,28 ± 0,36 ab
BA	0,1	Apical	5,56 ± 3,21 d	2,00 ± 0,58 b	1,37 ± 0,23 a
		Basal	6,25 ± 3,61 d	1,50 ± 0,50 b	2,05 ± 0,15 ab
	0,2	Apical	11,90 ± 1,76 cd	2,25 ± 0,45 b	1,66 ± 0,31 a
		Basal	43,06 ± 7,31 abc	3,20 ± 0,50 b	1,93 ± 0,18 ab
	0,5	Apical	8,06 ± 5,28 d	5,33 ± 1,20 a	2,03 ± 0,49 a
		Basal	11,81 ± 4,55 cd	2,75 ± 1,11 ab	1,93 ± 0,39 abc

Os valores representam médias ± erros-padrão de 4 repetições com 10 rebentos para cada. Para cada variável efectuou-se uma análise estatística conjunta, independentemente do tipo de explantado (apical ou basal), citocinina ou concentração. Para cada variável valores com letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

Os rebentos apicais inoculados em meio suplementado com $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA e o ensaio controlo com rebentos basais foram os que obtiveram o maior número de raízes por rebento ($5,33 \pm 1,20$ e $2,62 \pm 0,42$, respectivamente), embora sem diferenças significativas ($P \geq 0,05$). O alongamento das raízes foi superior no ensaio controlo (rebento apical), $2,81 \pm 0,15 \text{ cm}$, no entanto não se observaram diferenças significativas.

2.4.1.3. Enraizamento dos rebentos

Apesar de os rebentos de *T. major* terem revelado uma elevada capacidade rizogénica durante a fase de multiplicação, era necessário aumentar as percentagens de enraizamento tendo em vista a propagação em larga escala desta espécie. Além disso, durante a fase de multiplicação, o enraizamento ocorre em simultâneo com a multiplicação dos rebentos sendo necessária a separação da plântula principal dos restantes rebentos aquando da transferência para as condições *ex vitro*, tornando o processo pouco prático. Assim, o objectivo desta fase foi otimizar os resultados de enraizamento de rebentos desta espécie. Para tal, testaram-se os meios MS e 1/2MS suplementados com as auxinas IBA e NAA nas concentrações $0,2$ e $0,5 \text{ mg l}^{-1}$.

De um modo geral obtiveram-se elevadas percentagens de enraizamento em todos os meios testados (entre $75 \pm 9,72\%$ e 100%) (Figura 2.9). Independentemente dos outros factores testados, o meio 1/2MS foi significativamente superior ao meio MS ($P < 0,01$) em termos de frequência de enraizamento. Resultados semelhantes foram observados por Mkada *et al.* (1991) em *Cistus × purpureus* e Morte & Honrubia (1992) em *Helianthemum almeriense* Pau (Cistaceae). No entanto, quando se compara as diferentes auxinas e o ensaio controlo para cada meio basal *per si*, constata-se não existirem diferenças significativas ($P \geq 0,05$) entre meios. As percentagens de enraizamento mais elevadas (100%) foram obtidas no ensaio controlo e em meio basal 1/2MS suplementado com a auxina NAA.

Relativamente ao número de raízes desenvolvidas por rebento, no meio 1/2MS não se verificaram diferenças significativas entre as várias auxinas e o ensaio controlo, enquanto que no meio basal total, a auxina IBA a uma concentração de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ permitiu obter maior número de raízes por rebento ($6,78 \pm 0,85$). No entanto só se destacou significativamente ($P < 0,05$) do ensaio controlo e do meio contendo a mesma auxina com concentração mais baixa.

De um modo geral, em meios suplementados com a auxina NAA o alongamento das raízes foi suprimido. Por um lado, em meio basal total, o ensaio controlo e a auxina IBA a uma concentração de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ permitiram obter raízes mais longas ($2,81 \pm 0,15 \text{ cm}$ e $2,79 \pm 0,14 \text{ cm}$, respectivamente), enquanto que em meio 1/2MS o ensaio controlo e o ensaio com a auxina IBA a uma concentração de $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ apresentaram um maior alongamento das raízes ($2,94 \pm 0,16 \text{ cm}$ e $2,67 \pm 0,15 \text{ cm}$, respectivamente).

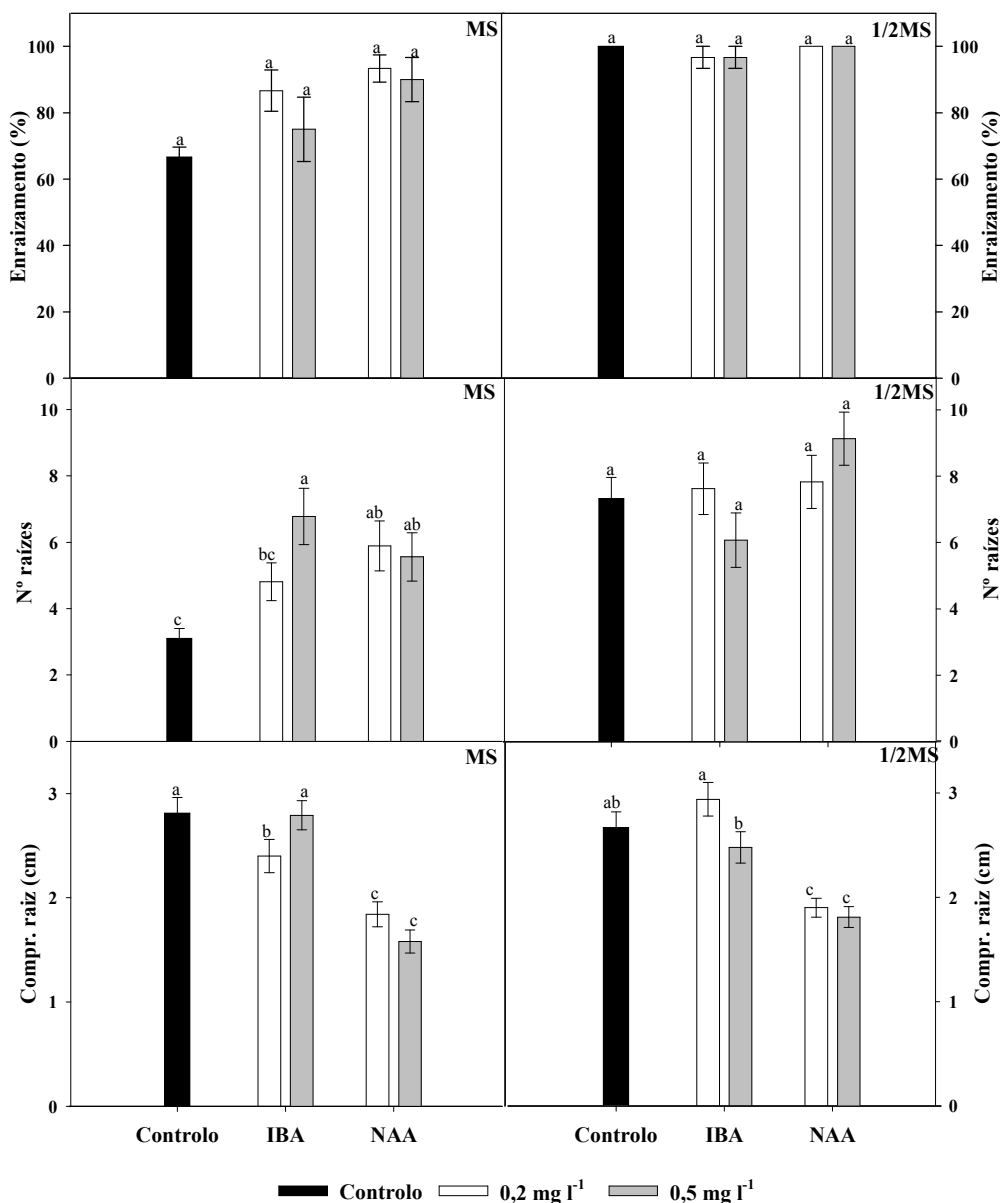


Figura 2.9. Efeito do meio basal (MS e 1/2MS), das auxinas (IBA e NAA) e da sua concentração ($0,2$ e $0,5 \text{ mg l}^{-1}$) no enraizamento de rebentos, número de raízes desenvolvidas por rebento e no comprimento da raiz mais longa. Os valores representam médias e as barras verticais representam os erros-padrão de 5 repetições com 6 rebentos cada, por meio basal, auxina e concentração. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

Analisando os dados de um modo geral constata-se que o factor com maior influência na indução de raízes é a concentração em sais do meio basal. A sua redução para metade melhorou significativamente os resultados ($P < 0,01$). Por sua vez, a adição de auxinas não induziu diferenças significativas relativamente ao ensaio controlo, verificando-se até no caso da auxina NAA um efeito negativo no alongamento das raízes.

2.4.1.4. Aclimatização das plântulas

Durante a aclimatização das plântulas micropropagadas às condições *ex vitro* testaram-se dois tratamentos distintos de aclimatização. Num dos tratamentos algumas plântulas após 2 semanas em câmara de aclimatização foram transferidas para caixas de polietileno, onde permaneceram até ao final desta fase. No outro tratamento as plantas mantiveram-se as 6 semanas de aclimatização em câmara de aclimatização. Estudou-se ainda o efeito do meio de cultura utilizado durante o enraizamento (MS total e 1/2MS) na performance das plantas durante a aclimatização. Na Figura 2.10 estão representados os resultados obtidos relativos à sobrevivência (%), número de folhas novas e altura do caule.

Verificou-se que as percentagens de sobrevivência mais elevadas foram obtidas para as plântulas aclimatizadas em câmara de aclimatização durante 6 semanas e, embora sem diferenças significativas entre os dois meios de enraizamento, a maior percentagem de sobrevivência ($97,1 \pm 2,9\%$) foi obtida em plantas enraizadas em meio 1/2MS (Figura 2.10).

Quanto ao desenvolvimento de folhas novas observou-se que estas aumentaram significativamente ao longo da fase de aclimatização. No final da segunda semana não se observaram diferenças entre os diferentes tratamentos testados. Nos resultados obtidos no final das quarta e sexta semanas observou-se que o número de folhas novas por plântula ($7,39 \pm 0,46$) foi significativamente superior ($P < 0,05$) em plantas provenientes de enraizamento em meio MS e que foram mantidas as 6 semanas em câmara de aclimatização.

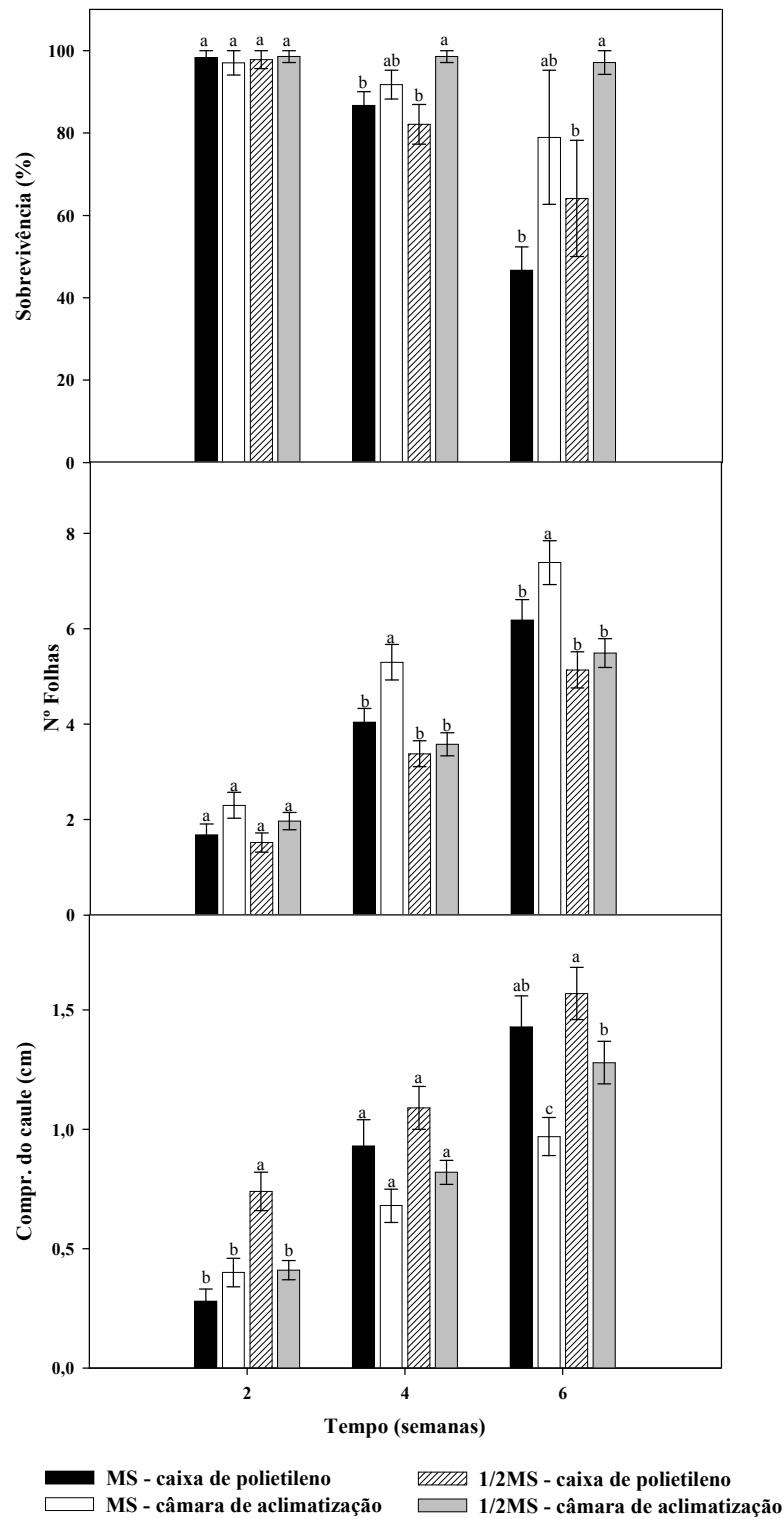


Figura 2.10. Efeito do meio basal e tratamento de aclimatização na sobrevivência (%), no número de folhas novas por plântula e altura do caule. Os valores representam médias e as barras verticais representam os erros-padrão de 5 repetições de 6 plântulas cada. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). A análise estatística foi avaliada por período de aclimatização (2, 4 e 6 semanas).

As plântulas apresentaram um crescimento em altura apreciável ao longo da fase de aclimatização. No final da segunda semana de aclimatização, as plântulas em que houve um maior desenvolvimento do caule foram as transferidas para as caixas de polietileno e provenientes de enraizamento em meio 1/2MS, obtendo-se resultados ($0,74 \pm 0,08$ cm) significativamente superiores ($P < 0,05$). No final da quarta semana não se obtiveram resultados significativamente diferentes ($P \geq 0,05$), embora as plântulas transferidas para as caixas de polietileno, alcançassem alturas superiores ($0,93 \pm 0,11$ cm para o MS total e $1,09 \pm 0,09$ cm para 1/2MS). No final da aclimatização verificou-se que as plântulas transferidas para as caixas de polietileno apresentaram alturas superiores ($1,43 \pm 0,13$ e $1,57 \pm 0,11$ cm para o meio MS e 1/2MS, respectivamente). O maior crescimento observado nas plantas aclimatizadas em caixas de polietileno poderá estar relacionado com a mais baixa intensidade luminosa verificada nas caixas, o que pode ter provocado o estiolamento das plantas.

Fazendo uma análise global dos resultados, verificou-se que a percentagem de sobrevivência mais elevada se verificou no tratamento em que as plantas foram mantidas 6 semanas na câmara de aclimatização. Este será o método mais adequado para aclimatizar plantas desta espécie tendo em vista a produção de plantas em larga escala.

2.4.2. Criopreservação

2.4.2.1. Criopreservação de sementes

O armazenamento de sementes a longo prazo em azoto líquido é o método mais simples e eficiente para a conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais (González-Benito & Pérez-García, 2001). Este método surge como alternativa ao banco de sementes tradicional, onde frequentemente se verifica a deterioração das sementes (Pérez-García & González-Benito, 2008). Na Figura 2.11 apresentam-se os resultados do efeito do pré-tratamento (60 min 100 °C) e temperatura de germinação (15 °C e 15/25 °C) em sementes de *T. major* armazenadas em LN durante 30 dias. É claro o efeito positivo que o pré-tratamento tem no aumento da percentagem de germinação das sementes. As sementes criopreservadas sem terem sido submetidas a pré-tratamento, apresentaram uma percentagem de germinação de $5 \pm 1,91\%$ e $6 \pm 2\%$ para 15 °C e 15/25 °C, respectivamente. No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre as

temperaturas de germinação. As sementes criopreservadas após pré-tratamento de calor alcançaram percentagens de germinação de $65 \pm 5,74\%$ e $67 \pm 5,26\%$ para 15 °C e $15/25\text{ °C}$, respectivamente. Por outro lado, comparando estes resultados com as percentagens de germinação obtidas na micropropagação ($58,33 \pm 1,67\%$ e $63,33 \pm 16,67\%$ para os 15 °C e $15/25\text{ °C}$, respectivamente) (Figura 2.7), concluiu-se que a criopreservação aumentou ligeiramente as percentagens de germinação, embora não se tenham verificado diferenças significativas ($P \geq 0,05$).

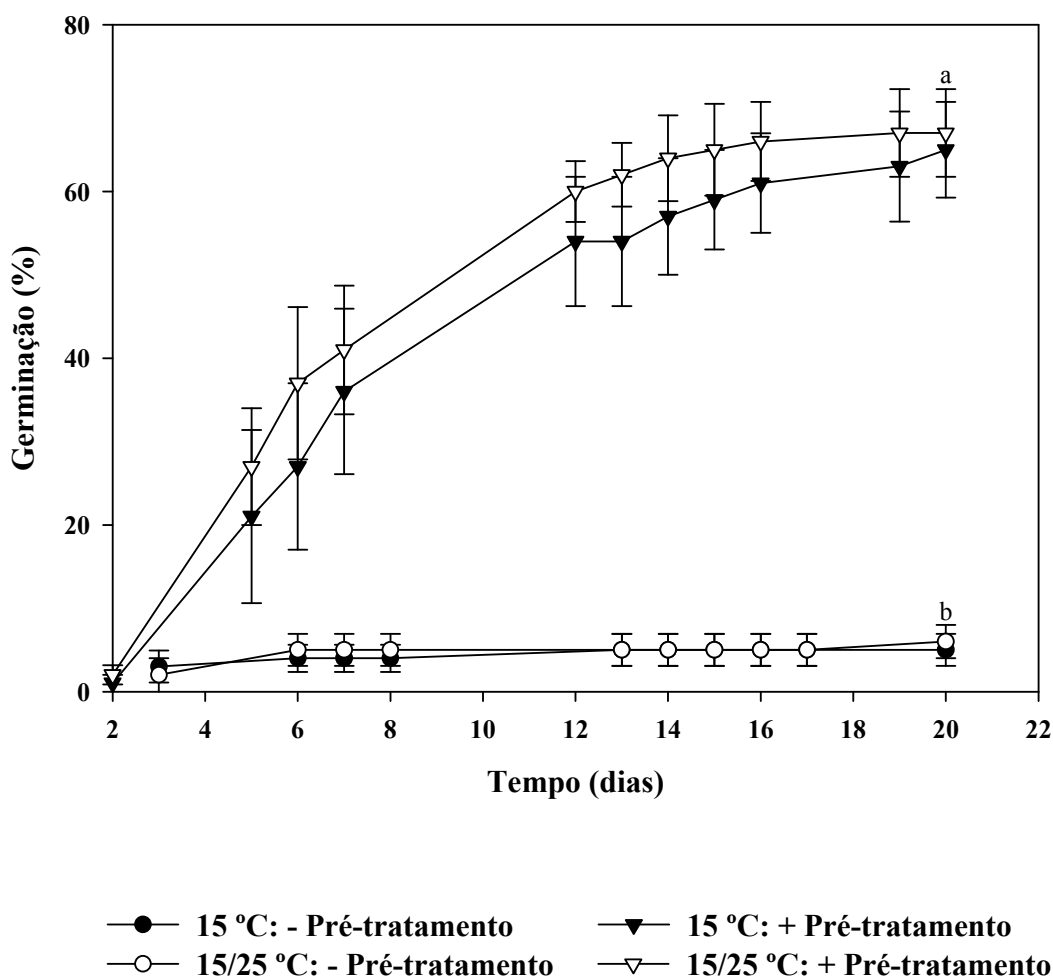


Figura 2.11. Efeito do pré-tratamento e da temperatura de incubação na germinação (%) de sementes de *T. major* criopreservadas durante 1 mês. Os valores representam médias e as barras verticais os erros-padrão de 4 repetições de 25 sementes.

Na tabela 2.4 verificou-se que nas sementes não criopreservadas o tempo médio de germinação (TMG) aumentou com o aumento da temperatura de incubação durante o período de germinação, indicando que as sementes de *T. major* germinam mais

rapidamente a temperaturas mais baixas, à semelhança do que acontece em outras espécies da mesma família (Pérez-García & González-Benito, 2006). Nas temperaturas em que se compararam sementes criopreservadas e não criopreservadas (ambas sujeitas a pré-tratamento), verificou-se que as sementes criopreservadas e germinadas a uma temperatura de 15 °C, atingiram um TMG superior (9,36 dias) comparativamente com o valor (8,19 dias) obtido pelas sementes germinadas à mesma temperatura embora não criopreservadas, demonstrando que a criopreservação aumentou o tempo de germinação. No entanto, relativamente à temperatura alternada (15/25 °C), verificou-se o inverso, isto é, as sementes criopreservadas obtiveram um TMG inferior (9,05 dias) comparativamente com o TMG obtido pelas sementes não criopreservadas (9,25 dias), evidenciando que a criopreservação não afectou negativamente o TMG destas sementes. É evidente que nas sementes criopreservadas e sem pré-tratamento, por germinarem poucas sementes se obteve um TMG inferior (3,50 e 4,88 dias para 15 °C e 15/25 °C, respectivamente), pois estas sementes germinaram logo nos primeiros dias da fase de germinação.

Tabela 2.4. Efeito do pré-tratamento, da temperatura de incubação e da criopreservação durante 1 mês no tempo médio de germinação de sementes (dias) de *T. major*. As sementes que não foram imersas em LN, foram sujeitas a pré-tratamento (1h a 100 °C).

Temperatura	15			20		15/25		25
Condições	- LN	+ LN		- LN	- LN	+ LN		- LN
		- Pré-tratamento	+ Pré-tratamento			- Pré-tratamento	+ Pré-tratamento	
TMG (dias)	8,19	3,50	9,36	8,78	9,25	4,88	9,05	10,01

Após a análise dos resultados obtidos nos ensaios de criopreservação de sementes é de realçar que, a aplicação do pré-tratamento de calor é essencial para obter uma percentagem de germinação elevada, mesmo após criopreservação, e que a temperatura de incubação não influencia significativamente a percentagem de germinação. Por último, o armazenamento das sementes em LN durante 30 dias não afectou negativamente a percentagem de germinação, comparativamente com os resultados obtidos no ensaio de germinação da micropropagação ($58,33 \pm 1,67\%$ e $63,33 \pm 16,67\%$ para os 15 °C e 15/25 °C, respectivamente) (Figura 2.7). Resultados semelhantes foram

observados em outras espécies da família Cistaceae (González-Benito *et al.*, 1998; Pérez-García & González-Benito, 2008).

2.4.2.2. Criopreservação de ápices

Apesar da criopreservação de sementes ser o método mais usado devido à sua simplicidade, em algumas espécies de plantas este método não pode ser utilizado por não serem produzidas quantidades suficientes de sementes (González-Benito & Pérez, 1994). Para a espécie *T. major*, por ser considerada em elevado risco de extinção (Gomes & Ferreira, 2005), existe um reduzido número de sementes disponível, logo torna-se necessário estabelecer medidas alternativas de conservação. A utilização de ápices para a criopreservação de germoplasma vegetal surge como uma alternativa adequada uma vez que os ápices são o material ideal porque as células que os constituem são pouco diferenciadas e geneticamente estáveis (Paulet *et al.*, 1993). As novas plantas produzidas a partir dos ápices serão idênticas à planta-mãe, em contraste com o que se passa com plantas produzidas a partir de outros tipos de material (Gonzalez-Arnan *et al.*, 1998). Os ápices apresentam ainda outras vantagens para a criopreservação, nomeadamente o tamanho reduzido e alto potencial para a tolerância osmótica (Gagliardi *et al.*, 2003).

2.4.2.2.1. Vitrificação

A chave para o sucesso da criopreservação através da vitrificação é por um lado o controlo da fase de desidratação e por outro prevenir os danos provocados pela toxicidade química ou pelo excessivo stress osmótico durante o tratamento com a solução PVS2 (Niino *et al.*, 1997). Deste modo, a optimização do tempo de exposição à solução PVS2 é muito importante para garantir boa resposta de viabilidade e crescimento dos rebentos após vitrificação (Sakai & Engelmann, 2007).

Analisando os resultados obtidos com ápices não criopreservados (Figura 2.12), verificou-se que todos os ápices testados no ensaio em que não foram expostos à solução PVS2 (100%) e no ensaio de 60 min (100%) de exposição à PVS2 formaram novos rebentos. Entre os tempos testados, o ensaio de 30 min de exposição à PVS2 demonstrou ser o menos indicado para a obtenção de rebentos. Ainda assim permitiu obter uma percentagem de sobrevivência elevada ($86,67 \pm 13,33\%$). Relativamente aos

ápices criopreservados, a percentagem de ápices que formou rebentos foi superior para o ensaio de 60 min ($60 \pm 13,88\%$) (Estampa 2.4D). Paralelamente ao que aconteceu com os ápices que não foram imersos em LN, a partir dos 60 min de exposição à solução vitrificante, a percentagem de ápices que formou rebentos decresceu, resultado este já anteriormente observado por Sakai & Engelmann (2007). Estes resultados demonstram que a vitrificação causou uma perda adicional de viabilidade para além daquela produzida durante a desidratação pela solução PVS2. Deste modo, pode constatar-se que as condições testadas neste trabalho terão de ser optimizadas para incrementar a tolerância à desidratação, visando a obtenção de uma percentagem mais elevada de rebentos formados em ápices de *T. major*.

O tempo de exposição à solução PVS2 pode estar associado ao tamanho e estrutura dos ápices excisados e parece ser altamente específico para cada espécie. Geralmente, os ápices com um tamanho inferior a 0,5 mm são altamente sensíveis ao tratamento com PVS2 e produzem baixos níveis de sobrevivência. Por outro lado, ápices maiores que 3 mm requerem um tempo de desidratação mais longo (Sakai & Engelmann, 2007).

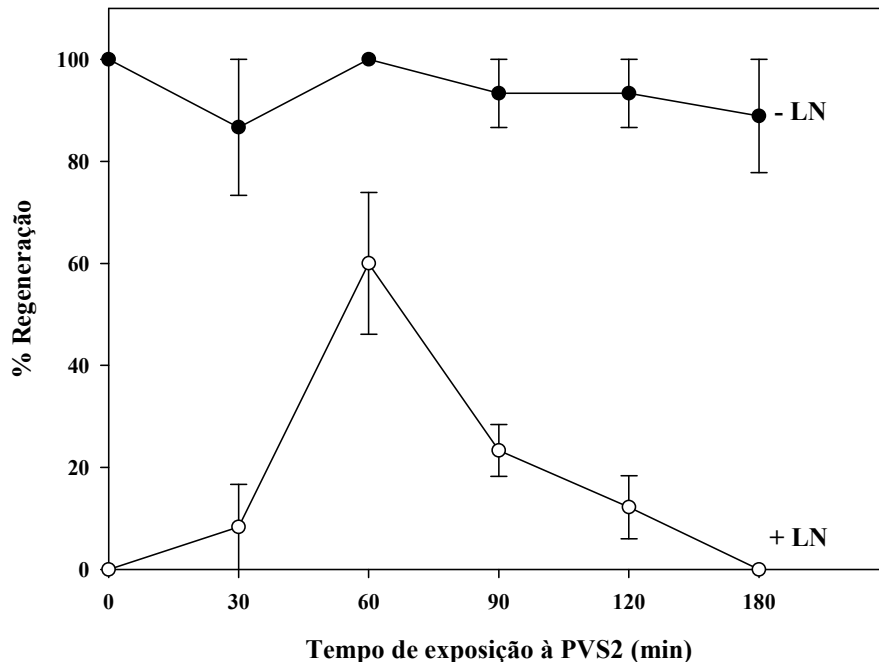


Figura 2.12. Efeito do tempo de exposição à PVS2 na percentagem de regeneração de ápices de *T. major* não criopreservados ou criopreservados pelo método de vitrificação. Os valores representam médias e as barras verticais os erros-padrão de 3 repetições de 5 ápices.

Os resultados obtidos poderiam ser melhorados sendo para isso necessário estudar as pré-condições de cultura, nomeadamente pré-cultura em meio suplementado com altas concentrações de sacarose durante diferentes períodos de tempo ou aclimatização a frio, otimizar o tratamento com a solução “loading”, testando diferentes soluções, e o tempo e temperatura de exposição à solução vitrificante PVS2.

2.4.2.2.2. Vitrificação “droplet”

Esta técnica recente, apesar de aplicada apenas a um número reduzido de espécies, tem permitido melhorar consideravelmente as taxas de regeneração após criopreservação (Sant *et al.*, 2008).

Os resultados apresentados na Figura 2.13 relativos à percentagem de rebentos formados a partir de ápices não criopreservados (-LN) são os mesmos aos utilizados no ensaio controlo do método anterior (vitrificação). Relativamente aos ápices que foram imersos em LN, o tempo de exposição à PVS2 mais favorável foi o do ensaio de 120 min tendo $31,43 \pm 8,57\%$ dos ápices desenvolvido rebentos (Estampa 2.4E). A partir do ensaio de 120 min há um decréscimo acentuado do número de rebentos formados.

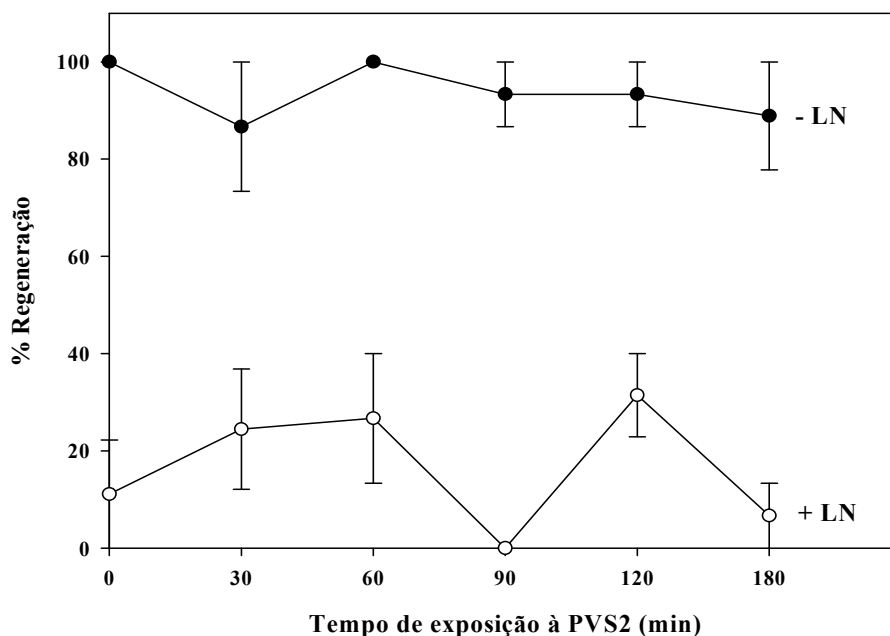


Figura 2.13. Efeito do tempo de exposição à PVS2 na percentagem de regeneração de ápices de *T. major* não criopreservados ou criopreservados pelo método de vitrificação “droplet”. Os valores representam médias e as barras verticais os erros-padrão de 3 repetições de 5 ápices.

Comparando o método de vitrificação “droplet” com o método do qual é derivado (vitrificação) constatou-se que na vitrificação “droplet” se atingiu uma percentagem de regeneração inferior ($31,43 \pm 8,57\%$) à observada na vitrificação ($60 \pm 13,88\%$). Este resultado contrasta com resultados obtidos por outros autores (Leunufna & Keller, 2003; Panis *et al.*, 2005). De modo a otimizar este método seria igualmente necessário otimizar todos os parâmetros referidos anteriormente nos resultados do método de vitrificação.

2.4.2.2.3. Encapsulamento-desidratação

No método de encapsulamento-desidratação foi igualmente necessário otimizar o tempo de desidratação de modo evitar a formação intracelular de cristais de gelo durante a imersão em LN. Neste método não são utilizadas soluções químicas na fase de desidratação, evitando-se assim a sua toxicidade. Para tal, os ápices encapsulados em cápsulas de alginato são expostos ao ar proveniente da câmara de fluxo laminar.

Observando os resultados apresentados na Figura 2.14, verificou-se que os ápices que não foram imersos em LN atingiram a percentagem mais elevada de regeneração após 1 h de desidratação (100%) (Estampa 2.4C). A partir deste tempo, obtiveram-se progressivamente resultados mais baixos, obtendo-se apenas $16,67 \pm 9,62\%$ para os ápices desidratados durante 5 h. Relativamente aos ápices imersos em LN, somente no ensaio de 3 h de desidratação se obteve a percentagem mais elevada ($66,67 \pm 13,33\%$). Para tempos superiores as percentagens foram progressivamente diminuindo.

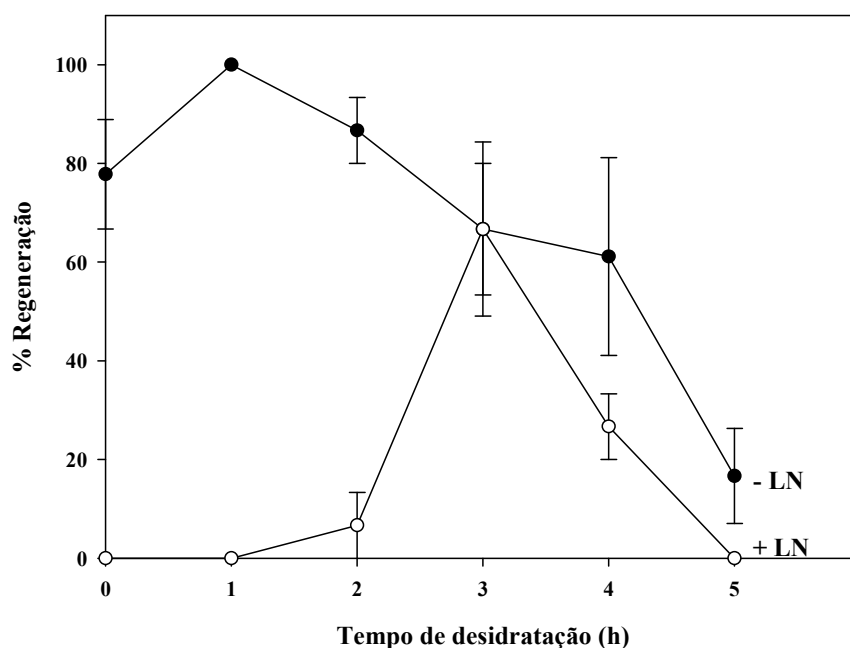


Figura 2.14. Efeito do tempo de desidratação na percentagem regeneração de ápices de *T. major* não criopreservados ou criopreservados pelo método de encapsulamento-desidratação. Os valores representam médias e as barras verticais os erros-padrão de 3 repetições de 5 ápices.

No método de encapsulamento-desidratação obtiveram-se resultados mais favoráveis ($66,67 \pm 13,33\%$) comparativamente com os métodos de vitrificação e vitrificação “droplet” ($60 \pm 13,88\%$ e $31,43 \pm 8,57\%$, respectivamente). Uma causa provável para se terem obtido melhores resultados no encapsulamento-desidratação foi o facto de não se utilizar a solução vitrificante PVS2 como método de desidratação, evitando assim a sua toxicidade. Segundo Niino *et al.* (1997) a redução na percentagem de ápices que formam rebentos pode estar associada à toxicidade química ou ao excessivo stress osmótico provocado durante o tratamento com a solução PVS2. O protocolo de vitrificação e o protocolo derivado (vitrificação “droplet”) tornam-se métodos muito intensos devido à manipulação de material mais pequeno (ápices com cerca de 2 mm) comparativamente ao que é manipulado no método de encapsulamento-desidratação (cápsulas de alginato com cerca de 5 mm de diâmetro).

2.5. Conclusões

Uma importante medida a incluir numa estratégia global de conservação para *T. major* é o reforço das populações naturais através da re-introdução de plantas produzidas *ex situ*. Quando se pretende reforçar populações naturais, a utilização da micropropagação é uma via válida para reduzir o risco de extinção de espécies ou populações ameaçadas. No entanto, segundo Siguero (1991), a propagação vegetativa pelas vias tradicionais é muito difícil na maioria das espécies da família Cistaceae. Assim sendo, o primeiro objectivo deste trabalho, foi desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* para a espécie de *T. major* partindo de sementes germinadas *in vitro*. A primeira fase deste protocolo foi a germinação de sementes *in vitro*, constatando-se que a aplicação de um pré-tratamento de calor é essencial para permitir a germinação. No entanto, a percentagem de germinação mais elevada não foi além dos 54%, sendo necessário otimizar estes resultados, aplicando outros pré-tratamentos às sementes, como por exemplo, a escarificação mecânica ou tratamentos com ácido sulfúrico. Entre as temperaturas de germinação testadas não se verificaram diferenças significativas, embora a percentagem de germinação mais elevada tenha sido alcançada em sementes expostas à temperatura alternada (15/25 °C), atingindo os $63,33 \pm 16,67\%$. Nesta fase obteve-se um número de germinantes suficiente para prosseguir para a fase seguinte, a multiplicação dos rebentos. O meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ Zea demonstrou ser o meio mais adequado para multiplicar *in vitro* rebentos desta espécie. Na fase de enraizamento, o parâmetro que mais influenciou os resultados foi a redução dos sais do meio MS. As auxinas e respectivas concentrações, não influenciaram significativamente os resultados, demonstrando não serem essenciais para a indução de enraizamento nesta espécie. Posteriormente as plântulas obtidas na fase de enraizamento e que apresentavam tamanho suficiente foram transferidas para condições *ex vitro*. Verificou-se que $97,1 \pm 2,9\%$ das plantas, provenientes do enraizamento em meio 1/2MS, sobreviveram após 6 semanas de aclimatização, demonstrando que é possível produzir em larga escala plantas desta espécie.

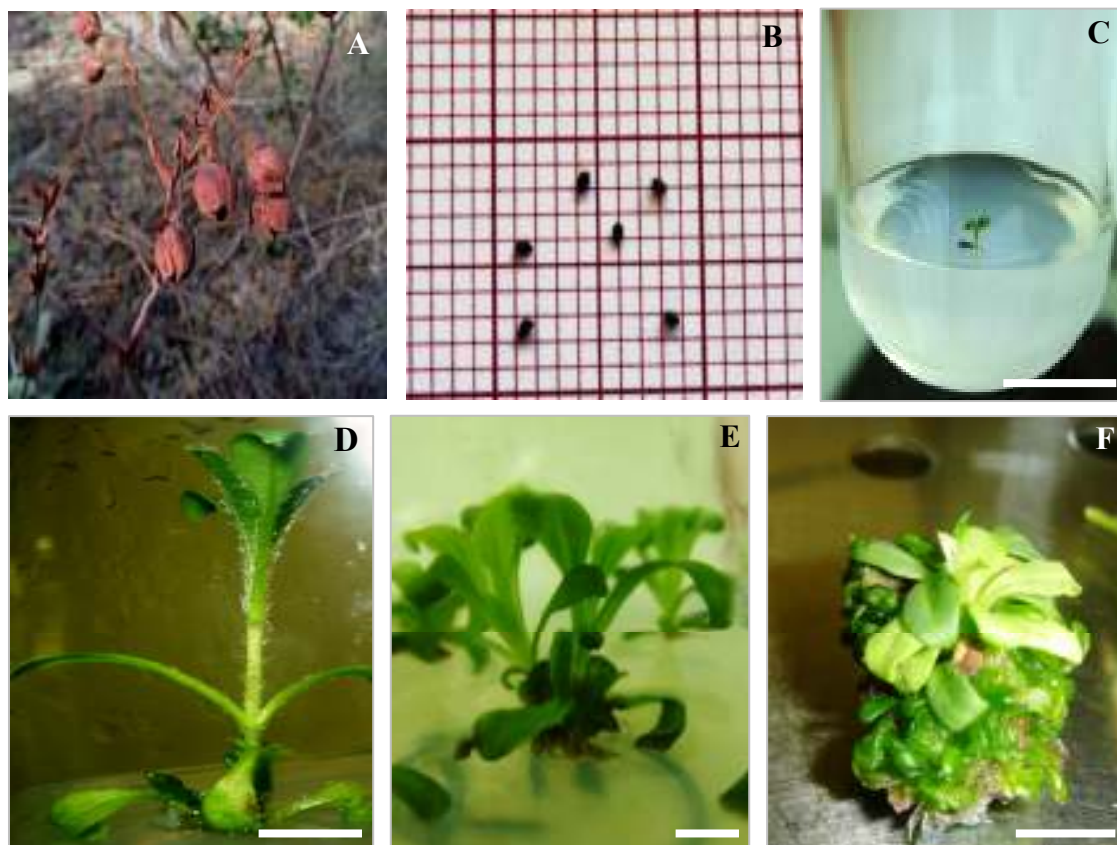
Outro objectivo proposto para este trabalho foi a aplicação de métodos para a conservação a longo prazo de germoplasma de *T. major* recorrendo à criopreservação de sementes e de ápices. A criopreservação de sementes é o método de armazenamento mais simples. No entanto, muitas vezes este método não pode ser aplicado em algumas espécies pois as sementes produzidas são insuficientes ou as populações da planta em

questão não são numerosas, como é o caso das plantas em vias de extinção. A criopreservação de ápices surge como alternativa a este método, porque os ápices são o material vegetal preferencial. Relativamente aos resultados obtidos na criopreservação de sementes verificou-se que o armazenamento das sementes em LN durante 30 dias não afectou negativamente a percentagem de germinação. Outra das conclusões alcançadas nesta fase do trabalho foi o facto de se verificar que as sementes de *T. major* germinam mais rapidamente a temperaturas mais baixas (8,19 dias e 10,01 dias para os 15 °C e 25 °C, respectivamente. Quanto à criopreservação de ápices, estudaram-se três métodos: vitrificação, vitrificação “droplet” e o encapsulamento-desidratação. Comparando o método de vitrificação “droplet” com o método do qual é derivado (vitrificação) constatou-se que a vitrificação permitiu atingir maior percentagem de ápices que formou rebentos após criopreservação ($60 \pm 13,88 \%$) que a obtida pela vitrificação “droplet” ($31,43 \pm 8,57 \%$). No entanto, o melhor valor foi obtido com o encapsulamento-desidratação ($66,67 \pm 13,33 \%$), sendo aparentemente este o método mais adequado para criopreservar ápices desta espécie

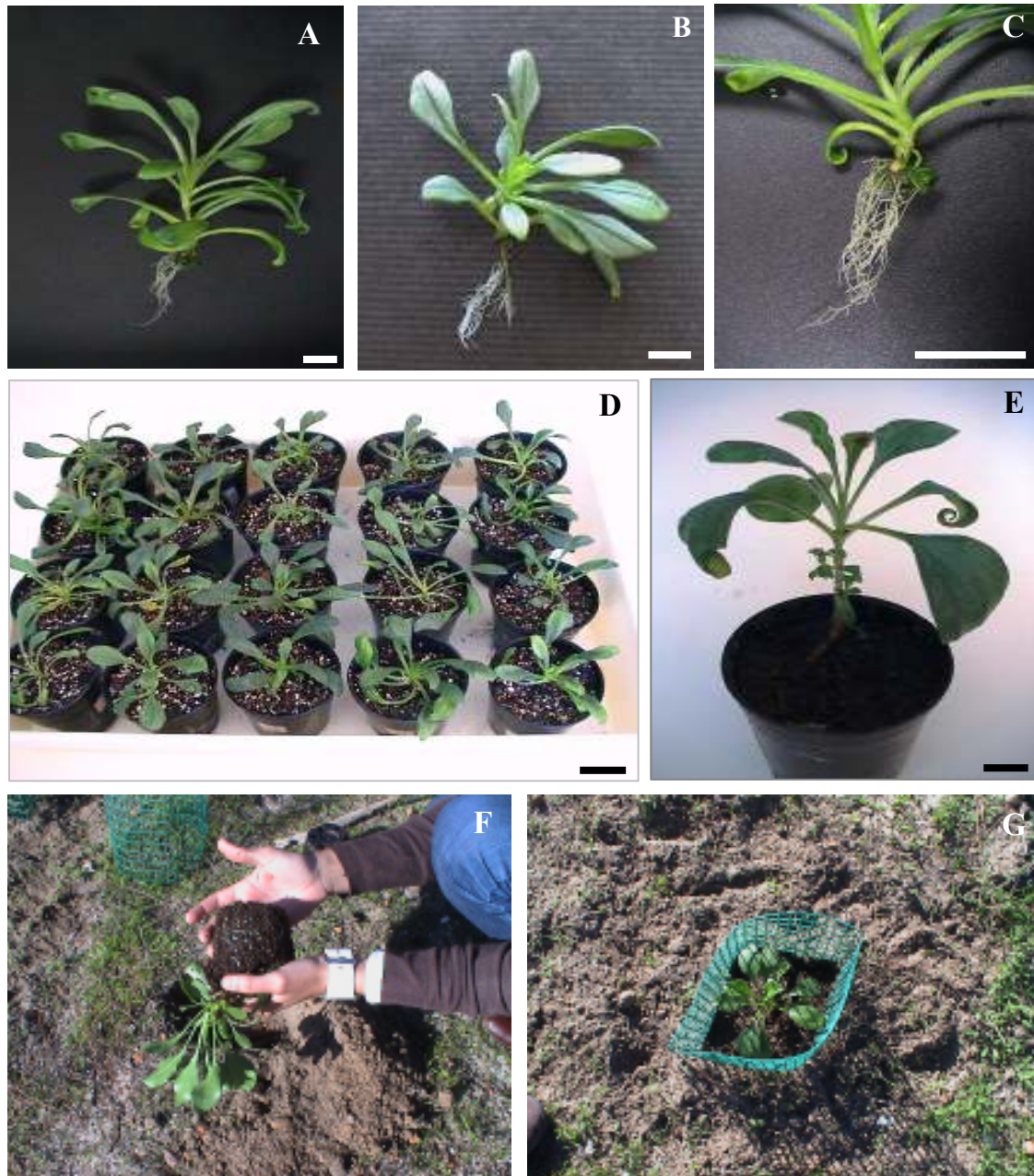
Os resultados obtidos demonstraram que as técnicas de cultura *in vitro* de tecidos vegetais são uma via indicada para produzir *ex situ* plantas de *T. major* a partir de sementes e conservar germoplasma vegetal durante longos períodos de tempo. Estes protocolos poderão ser aplicados para produzir plantas que posteriormente poderão ser re-introduzidas e usadas para reforçar populações naturais desta espécie que se encontrem mais ameaçadas.



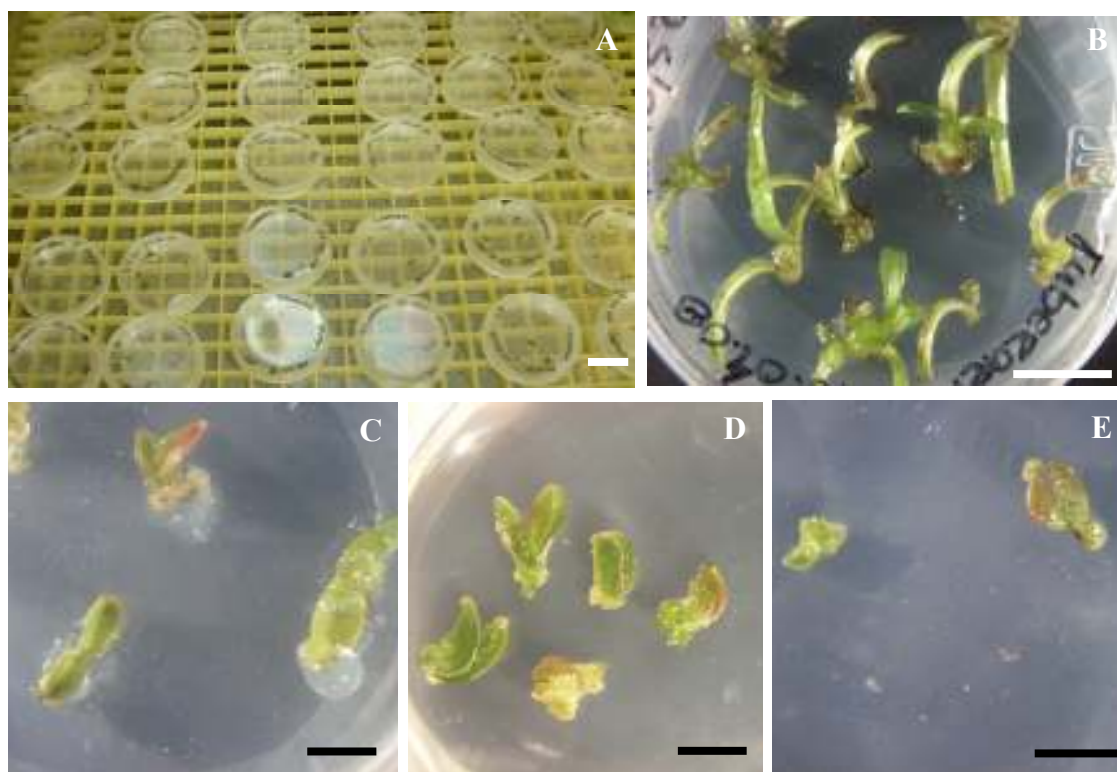
Estampa 2.1. Diferentes aspectos da planta *T. major*. (A) Planta inteira; (B) planta em fase de floração; (C) plântulas provenientes da germinação de sementes após um incêndio; (D) pormenor da planta em fase de floração.



Estampa 2.2. Diferentes aspectos das fases de germinação de sementes e multiplicação *in vitro* de *T. major* (barra = 1 cm). (A) cápsulas onde se encontram inseridas as sementes; (B) sementes utilizadas na fase da germinação *in vitro*; (C) rebento proveniente da germinação em meio 1/4MS; (D, E, F) rebentos provenientes da fase final de multiplicação de rebentos basais em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Kin, 0,2 mg l⁻¹ Zea e 0,2 mg l⁻¹ BA, respectivamente.



Estampa 2.3. Diferentes aspectos das fases de enraizamento de rebentos *in vitro* e aclimatização de plântulas micropropagados de *T. major*. (A) Rebento no final do enraizamento *in vitro* em meio de cultura 1/2MS suplementado com 0,5 mg l⁻¹ IBA (barra = 1 cm); (B) rebento no final do enraizamento *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 0,5 mg l⁻¹ IBA (barra = 1 cm); (C) pormenor das raízes desenvolvidas em rebentos no final do enraizamento em meio 1/2MS suplementado com 0,5 mg l⁻¹ IBA (barra = 1 cm); (D) rebentos envasados no início da fase de aclimatização (barra = 2,5 cm); (E) planta aclimatizada a crescer no exterior (barra = 1,5 cm); (F, G) Transplante das plantas para o seu habitat natural.



Estampa 2.4. Diferentes aspectos de criopreservação de ápices de *T. major* recorrendo a vários métodos (barra = 1 cm). (A) formação de rebentos após a aplicação do método de encapsulamento-desidratação; (B) segmentos nodais inoculados em meio de cultura MS suplementado com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ Zea para efectuar posteriormente a extracção de ápices; (C) rebentos formados de ápices criopreservados pelo método de encapsulamento-desidratação; (D) rebentos formados de ápices criopreservados pelo método de vitrificação; (E) rebentos provenientes de ápices criopreservados pelo método de vitrificação “droplet”.



3.1. Introdução

Plantago algarbiensis Samp. (1914), vulgarmente conhecida por Diabelha-do-Algarve, é uma espécie pertencente à família Plantaginaceae. *P. algarbiensis*, igualmente designada por *Plantago bracteosa* (Willk.) Samp. (ICN, 2006), não era colectada desde 1887, tendo sido intensamente prospectada desde 1990 e reencontrada em 1996. A actual classificação taxonómica desta espécie está demonstrada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Actual classificação taxonómica de *P. algarbiensis*.

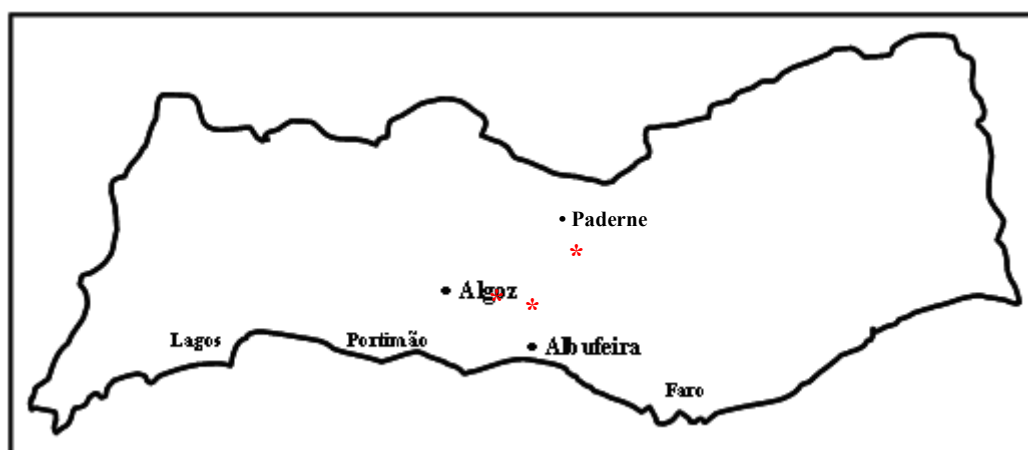
Reino	Planteae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Lamiales
Família	Plantaginaceae
Género	Plantago
Espécie	<i>Plantago algarbiensis</i>

Plantaginaceae é uma família de plantas angiospérmicas que ocorrem sobretudo em zonas temperadas, constituída por ervas, arbustos e em alguns casos por plantas aquáticas com raízes. Esta família é constituída por 3 géneros e 254 espécies, 33 (12%) das quais se encontram em perigo de extinção.

A espécie *P. algarbiensis* é uma planta vivaz ou bienal contendo as gemas de renovo à superfície do solo. Estas plantas podem atingir uma altura entre 7 e 30 cm (Estampa 3.1). Contém toíça lenhosa raramente dividida em duas, é designada como hemicriptófito arrosetado, isto é, apresenta todas as folhas, que são lineares e agudas, dispostas numa roseta basilar. Esta espécie floresce habitualmente entre Maio e Agosto e ocorre geralmente em solos argilosos, por vezes sujeitos a encharcamento temporário durante o Inverno e princípio da Primavera, tornando-se seco com a abertura de fendas na época mais seca. Tem preferência por zonas a jusante de pequenas nascentes de água ou clareiras de matos baixos acidófilos, por zonas de sedimentação com baixa diversidade e riqueza específica e também, por terrenos sujeitos a perturbação recente.

As populações localizadas dentro do Sítio Classificado do Barrocal (Figura 3.1) apresentam efectivos populacionais muito restritos, estimando-se abaixo dos 10000 indivíduos e ocupando cerca de 0,05 ha, aproximadamente 0,2% da área de ocupação da espécie. As populações mais densas e extensas localizam-se no exterior do Sítio Classificado, a sul da localidade de Algoz. Resumem-se em vários milhares de indivíduos e ocupam uma área de cerca de 29 ha (ICN, 2006).

Embora alguns indivíduos se organizem em pequenos núcleos distando normalmente vários metros, existem outros núcleos que são constituídos por dezenas de indivíduos de diferentes classes etárias. É conhecida a existência de várias sub-populações, algumas das quais isoladas, distando cerca de 6 km, sendo umas delas possuidora de 90% dos efectivos da espécie (ICN, 2006).



* - Núcleos de *P. algarbiensis*

Figura. 3.1. Distribuição geográfica das populações de *P. algarbiensis* na região do Algarve.

As populações ainda existentes são demograficamente tão pequenas que correm um sério risco de desaparecimento devido a qualquer acção humana. As explorações de argila para produção de materiais de construção civil, alterações topográficas resultantes da actividade mineira, com a consequente desorganização da rede de drenagem, expansão urbana, exploração florestal e promoção da pastagem constituem as principais ameaças para esta espécie. A relação entre aquele tipo de indústria extractiva e o *P. algarbiensis* não é todavia clara. Embora durante a lavra possam ser destruídos núcleos populacionais da espécie, admite-se que *P. algarbiensis* seja beneficiado pela deposição

de materiais sobrantes e, seguramente, pela exclusão de práticas agrícolas em áreas sujeitas a extracção de inertes. O coleccionismo botânico poderá também causar um agravamento da precariedade da espécie.

P. algarbiensis é uma espécie geográfica e demograficamente rara encontrando-se actualmente protegida pelo decreto-lei nº 140/99, de 24 de Abril – Anexos B-II, b) e B-IV, b) e pela Directiva 92/43/CEE – Anexos II, b) e IV, b). Pelo exposto torna-se urgente a necessidade de implementação de técnicas que visem a conservação desta espécie. Até aos dias de hoje, não são conhecidos trabalhos científicos que descrevam a propagação de *P. algarbiensis* com vista à produção de plantas para futura reposição no ambiente natural. Os avanços da biotecnologia, nomeadamente a cultura *in vitro*, surgem como um poderoso instrumento para a propagação em massa de espécies ameaçadas de extinção dando um importante contributo para a sua conservação.

3.1.1. Multiplicação *in vitro* via organogénese

Plantas completas podem ser obtidas *in vitro* por três vias principais: a partir de meristemas ou gemas pré-existentes, através de embriogénese somática e a partir da morfogénese de gemas aéreas adventícias (organogénese).

Considera-se adventícia a gema que se forma em qualquer parte da planta onde normalmente não ocorreria a sua formação, ou seja, fora do ápice caulinar ou axilas foliares. A gema é uma estrutura unipolar, cujo sistema vascular está em conexão com os tecidos de origem.

Christianson e Warnick (1988) dividiram o processo de organogénese *in vitro* nas seguintes fases: desdiferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão. A regeneração de plantas através de organogénese pode ocorrer de dois modos: directa, quando é feita através da produção de gemas aéreas adventícias directamente a partir do explantado, sem proliferação de tecidos não diferenciados ou indirectamente, havendo a regeneração de gemas aéreas adventícias a partir de *callus* derivados de explantados (Thomé *et al.*, 2004).

O processo de organogénese depende da acção de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas, e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (Carvalho-Alves *et al.*, 2004). As citocininas têm como função quebrar a dormência, e as auxinas promover o

alongamento dos rebentos. Embora um grande número de espécies responda a um balanço adequado de auxinas/citocininas formando rebentos caulinares e raízes, noutros casos este balanço hormonal conduz apenas à obtenção de *calli*.

A resposta organogénica pode ser influenciada por 3 principais factores: composição do meio de cultura, condições de cultura e factores relativos à planta-mãe. Na indução de organogénese, a resposta varia de espécie para espécie, com o tipo de regulador de crescimento, concentração e tempo de exposição a que os tecidos são submetidos. Dentro da mesma espécie há igualmente uma variação com o tipo de explantado utilizado.

A indução de organogénese é considerada um bom método de propagação, na medida em que se podem produzir centenas de rebentos a partir de um único explantado inicial. Teoricamente, o limite para o número de rebentos formados é o número de células do explantado. No entanto, somente uma pequena percentagem das células do explantado são induzidas, sendo o número de rebentos formados consideravelmente menor que o total de células existentes.

3.2. Objectivos

P. algarbiensis é uma espécie com características singulares e de elevado interesse. Sendo esta uma espécie endémica algarvia e em elevado risco de extinção, torna-se essencial o estudo de técnicas que visem a sua conservação. Com os avanços da biotecnologia, nomeadamente das técnicas de cultura *in vitro*, surge um poderoso instrumento para a propagação em massa de espécies ameaçadas de extinção dando o importante contributo para a sua conservação. A produção de rebentos via organogénese é uma via bastante utilizada, dado o sucesso já demonstrado em outras espécies. A produção de plantas *ex situ* e posterior re-introdução nas populações naturais existentes é uma das vias possíveis para o reforço do número de indivíduos nas populações ameaçadas.

Assim sendo, foram definidos os seguintes objectivos:

- i) germinar *in vitro* sementes de *P. algarbiensis* e a partir dos germinantes obtidos induzir a multiplicação de rebentos desta espécie;

- ii) induzir a formação de rebentos, via organogénese, a partir de segmentos de folha destacados de rebentos a crescer *in vitro*.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Material vegetal

A iniciação *in vitro* de *P. algarbiensis* foi efectuada recorrendo à germinação de sementes (Estampa 3.2A) recolhidas numa população natural perto de Algoz (Algarve).

3.3.2. Germinação e multiplicação dos rebentos

As sementes foram desinfectadas com lixívia comercial a 15% (v/v) (contendo 5% de cloro activo) durante 15 min seguindo-se 3 lavagens com água destilada estéril. Com o objectivo de verificar se esta espécie necessitava de algum tratamento que quebrasse a dormência, as sementes foram inoculadas em meio 1/4MS sem efectuar qualquer tipo de tratamento prévio. Num ensaio posterior as sementes foram sujeitas a escarificação mecânica antes da inoculação. As culturas foram incubadas em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h, com uma intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 8 semanas foi avaliada a percentagem de germinação.

Aos germinantes provenientes da germinação de sementes foram removidas as raízes e os rebentos usados para multiplicação *in vitro* em meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ BA, de modo a obter número suficiente de rebentos para utilizar nos ensaios subsequentes.

3.3.3. Organogénese

Nos ensaios de organogénese utilizaram-se como explantados secções foliares, de tamanho idêntico (aproximadamente 1 cm), destacadas de rebentos de *P. algarbiensis* a crescer *in vitro* em fase de multiplicação como atrás descrito. Utilizaram-se apenas as secções centrais da folha, tendo sido descartadas as secções próximas da zona de inserção, bem como a porção terminal da folha.

As secções de folha foram inoculadas com a parte abaxial em contacto com o meio MS suplementado com diferentes combinações de citocininas e auxinas (Tabela 3.2). As

culturas foram mantidas durante 6 semanas em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h, com uma intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Nestes ensaios foram utilizados frascos de vidro com 250 ml de volume (30 ml meio/frasco). Em cada frasco foram inoculadas 10 secções foliares e para cada meio testado foram efectuadas 4 repetições. Após as 6 semanas foi avaliada a percentagem de folhas que originou apenas *calli* e que originou rebentos (podendo incluir também *calli*). Avaliou-se igualmente, embora a olho nu, a percentagem de rebentos que, aparentemente, foram originados directamente da folha ou originados no *calli*. Foram ainda avaliados o número de rebentos originados de cada explantado, bem como o comprimento do maior rebento (cm).

Tabela 3.2. Resumo dos meios testados para a indução de rebentos de *P. algarbiensis* via organogénese.

Designação	Meio (MS)
M1	4 mg l ⁻¹ Zea
M2	4 mg l ⁻¹ Zea + 1 mg l ⁻¹ IAA
M3	4 mg l ⁻¹ Zea + 1 mg l ⁻¹ NAA
M4	4 mg l ⁻¹ BA
M5	4 mg l ⁻¹ BA + 1 mg l ⁻¹ IAA
M6	4 mg l ⁻¹ BA + 1 mg l ⁻¹ NAA

3.3.4. Multiplicação dos rebentos provenientes de organogénese

Os rebentos originados via organogénese foram posteriormente inoculados em meio de multiplicação de modo a avaliar a sua capacidade multiplicativa. Deste modo, os rebentos originados via organogénese em meios que continham Zea (M1, M2 e M3) foram inoculados em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea e os restantes rebentos provenientes de meios que continham BA (M4, M5 e M6) foram inoculados em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ BA. Como via de comparação em cada meio de multiplicação efectuaram-se ensaios com rebentos (culturas-mãe) provenientes da germinação *in vitro* de sementes (via micropropagação).

Os recipientes de cultura utilizados foram frascos de vidro com um volume de 250 ml. Todo o material utilizado nestes ensaios foi devidamente esterilizado. Após 6 semanas de cultura avaliou-se o número de rebentos desenvolvidos por cada rebento e do comprimento do maior rebento (cm).

3.4. Resultados e discussão

Neste trabalho não se observou germinação das sementes de *P. algarbiensis* na ausência de escarificação. A aplicação deste tratamento permitiu obter 80% de germinação (Estampa 3.2).

Segundo Perez (2004), as sementes viáveis que não germinam nas condições adequadas, são consideradas como dormentes. A dormência é um mecanismo através do qual as sementes, embora permanecendo viáveis, deixam de germinar mesmo quando submetidas a condições ambientais favoráveis. Através da dormência, as sementes mantêm a sua longevidade por um período de tempo mais longo, de modo a aumentar a possibilidade de sobrevivência da espécie. As causas mais comuns da dormência de sementes são a dureza do tegumento e a sua impermeabilidade à água. Esta situação de dormência pode ser suprimida por remoção de tegumento, física ou quimicamente, ou por lavagem da semente em água corrente uma vez que o tegumento representa a interface entre a semente e o ambiente, e qualquer interferência afecta igualmente a interacção entre o ambiente e o embrião (Souza *et al.*, 2007).

O meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ BA demonstrou ser eficaz para multiplicar *in vitro* rebentos de *P. algarbiensis* permitindo obter rebentos em quantidade suficiente ($7,21 \pm 0,96$) para serem usados como fonte de explantados a utilizar nos ensaios de organogénese (Estampa 3.3A, B).

Após 8 semanas de cultura nos vários meios testados, os explantados foram observados à vista desarmada, e foi verificado se originaram somente *calli* ou rebentos (independentemente de terem inicialmente passado por *calli* ou originados directamente a partir da folha). Os resultados obtidos (Figura 3.2) demonstraram que a percentagem mais elevada de explantados que originaram apenas *calli* foi obtida nos ensaios com os meios M3 e M6 ($40 \pm 20,41\%$ e $42,5 \pm 17,97\%$, respectivamente). No entanto, não se verificaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$). Nos ensaios com os meios M1, M4 e M5 não se observou apenas a formação de *calli* nos explantados. Por outro lado, em

todos os meios testados os explantados originaram rebentos (Estampa 3.3C, D), embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os vários meios ($P \geq 0,05$), possivelmente dada a variabilidade de resposta traduzida nos elevados valores de erros-padrão. De qualquer forma, o ensaio com o meio M2 destacou-se dos restantes com $55 \pm 8,66\%$ dos explantados a originar rebentos.

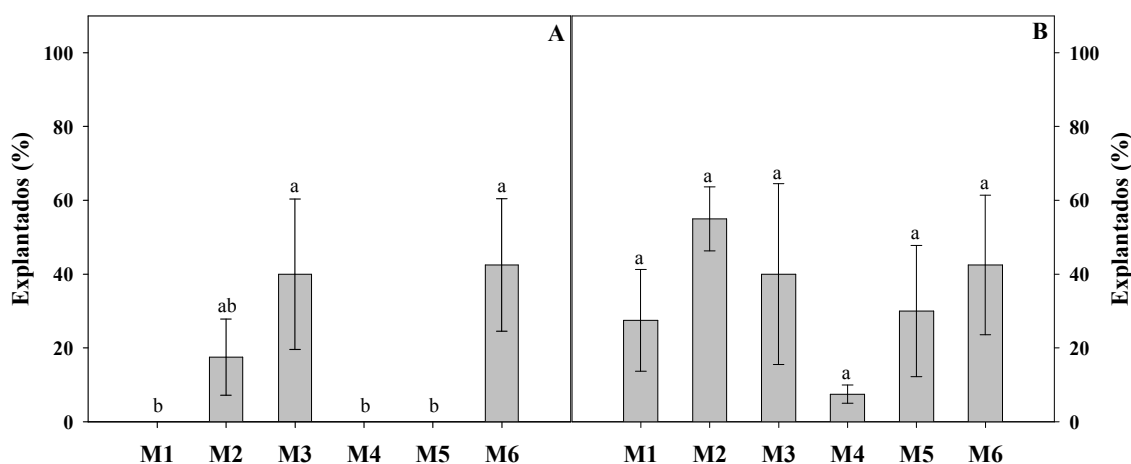


Figura 3.2. Efeito das citocininas e combinação entre citocininas e auxinas na percentagem de explantados que originaram apenas *calli* (A) ou que originaram somente rebentos ou rebentos e *calli* (B). Os valores representam médias e as barras verticais representam erros-padrão de 4 repetições com 10. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes para um $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Meios testados - M1: 4 mg l^{-1} Zea); M2: (4 mg l^{-1} Zea + 1 mg l^{-1} IAA); M3: (4 mg l^{-1} Zea + 1 mg l^{-1} NAA); M4: (4 mg l^{-1} BA); M5: (4 mg l^{-1} BA + 1 mg l^{-1} IAA) e M6: (4 mg l^{-1} BA + 1 mg l^{-1} NAA).

A influência do meio de cultura no número médio de rebentos formados e no seu comprimento apresenta-se na Figura 3.3.

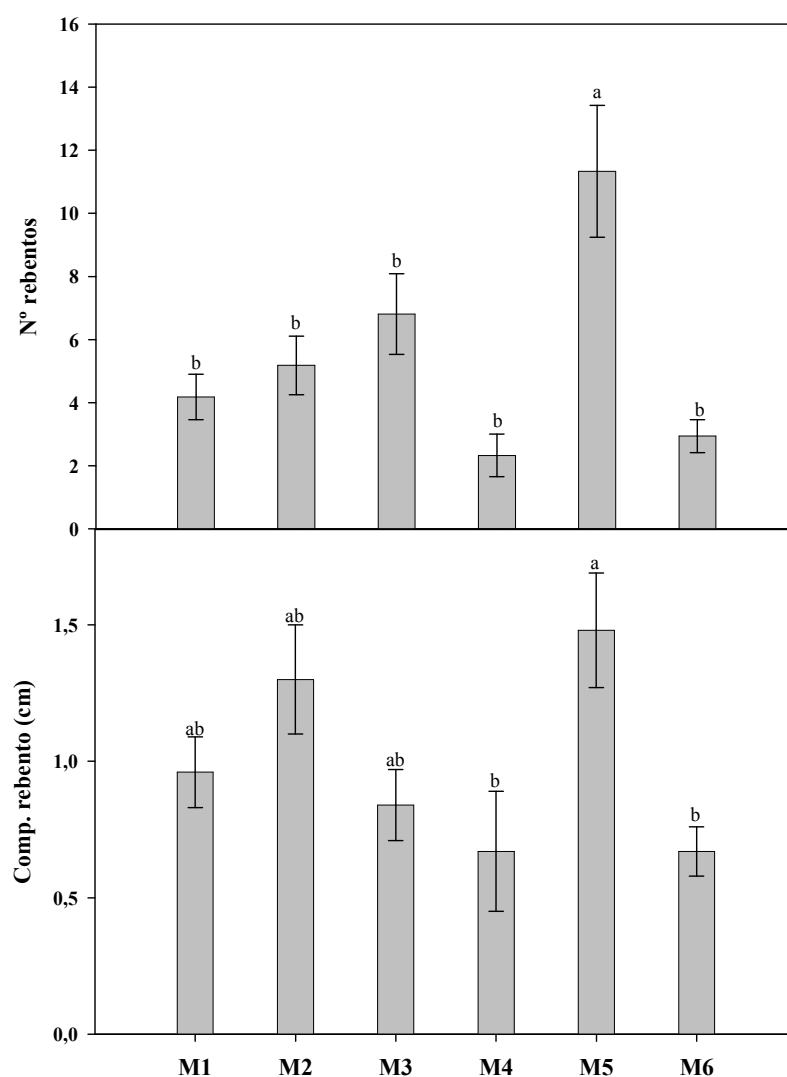


Figura 3.3. Efeito das citocininas e combinação entre citocininas e auxinas no número de rebentos desenvolvidos por cada explantado e no comprimento do maior rebento (cm). Os resultados representam médias e as barras verticais representam erros-padrão de 4 repetições de 10 rebentos. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Meios testados - M1: 4 mg l^{-1} Zea; M2: (4 mg l^{-1} Zea + 1 mg l^{-1} IAA); M3: (4 mg l^{-1} Zea + 1 mg l^{-1} NAA); M4: (4 mg l^{-1} BA); M5: (4 mg l^{-1} BA + 1 mg l^{-1} IAA) e M6: (4 mg l^{-1} BA + 1 mg l^{-1} NAA).

Verificou-se que o ensaio com o meio M5 induziu em média o maior número de rebentos por explantado inicial ($11,33 \pm 2,09$), apresentando diferenças significativas dos outros meios ($P < 0,05$).

Relativamente ao comprimento do maior rebento o ensaio com o meio M5 destacou-se novamente, permitindo um maior alongamento dos rebentos ($1,48 \pm 0,21 \text{ cm}$), embora o

valor obtido não seja significativamente diferente dos obtidos com os restantes meios de cultura ($P \geq 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos com explantados foliares de *Spilanthes acmella* (Saritha & Naidu, 2008) e em espécies do género *Plumbago* (Das & Rout, 2002).

Posteriormente os mesmos rebentos foram observados à vista desarmada para averiguar que percentagem de rebentos foi originada directamente a partir de folha ou a partir de *calli* (Figura 3.4) (Estampa 3.2C, D).

Verificou-se que os rebentos formados nos ensaios com os meios M2 e M6 são na sua maioria provenientes de *calli* (77,19 % e 71,76%, respectivamente). Nos ensaios com os meios M1 e M4 contendo apenas citocinina revelaram maior capacidade para induzir a formação de rebentos directamente a partir da folha, representando 89,13% e 100% dos rebentos, respectivamente. No ensaio com o meio M3 verificou-se na maioria a formação de rebentos directamente a partir da folha (89,91%). A combinação da citocinina BA e a auxina NAA (meio M6) provou ser a combinação menos eficaz de todos os meios testados, para a formação de rebentos directamente a partir da folha. Contudo, para afirmar com certeza se os rebentos vêm directamente da folha ou passam pela formação de *calli* seria necessário recorrer a cortes histológicos.

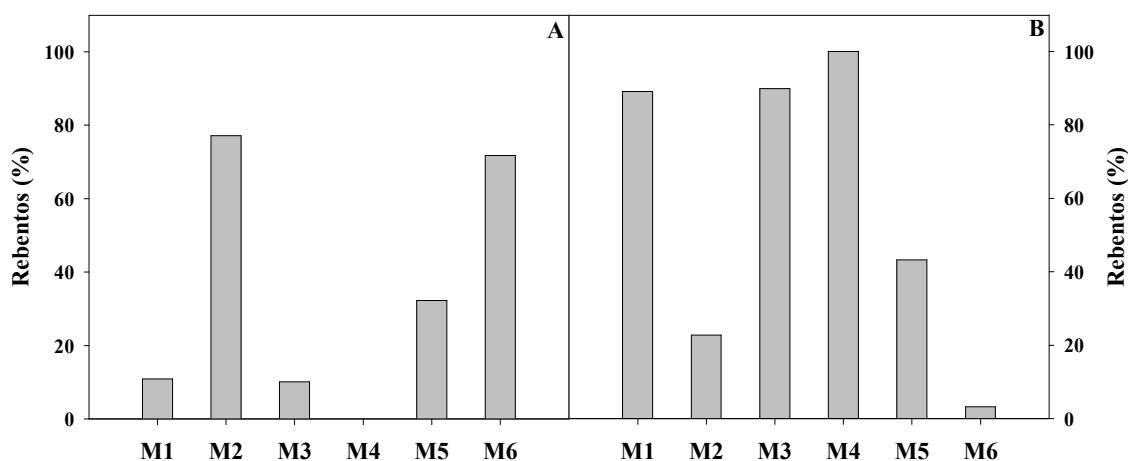


Figura 3.4. Influência das citocininas e combinação entre citocininas e auxinas na percentagem de rebentos originados a partir de *calli* (A) ou directamente da folha (B). Meios testados - M1: (4 mg l⁻¹ Zea); M2: (4 mg l⁻¹ Zea + 1 mg l⁻¹ IAA); M3: (4 mg l⁻¹ Zea + 1 mg l⁻¹ NAA); M4: (4 mg l⁻¹ BA); M5: (4 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ IAA) e M6: (4 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ NAA).

Em todos os meios testados, parte dos rebentos originados, quer por organogénese “directa” ou “indirecta”, apresentavam-se com aspecto hiperhidratado e acastanhado.

Segundo Sujatha & Kumar (2007) a hiperidricidade é um problema comum nestes casos.

Seguidamente avaliou-se a capacidade multiplicativa dos rebentos originados por organogénese (Figura 3.5). Consoante o meio de origem na organogénese os rebentos foram direccionados para meio de multiplicação contendo a mesma citocinina, isto é, os meios M1, M2 e M3 continham no meio a citocinina Zea, logo a capacidade multiplicativa foi avaliada em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea. Por outro lado, os ensaios com os meios M4, M5 e M6 continham a citocinina BA, logo a sua capacidade multiplicativa foi avaliada em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ BA. Para fins de comparação, foram efectuados ensaios de multiplicação, via micropropagação, em meio contendo a citocinina Zea ou BA a uma de 0,2 mg l⁻¹ (culturas-mãe).

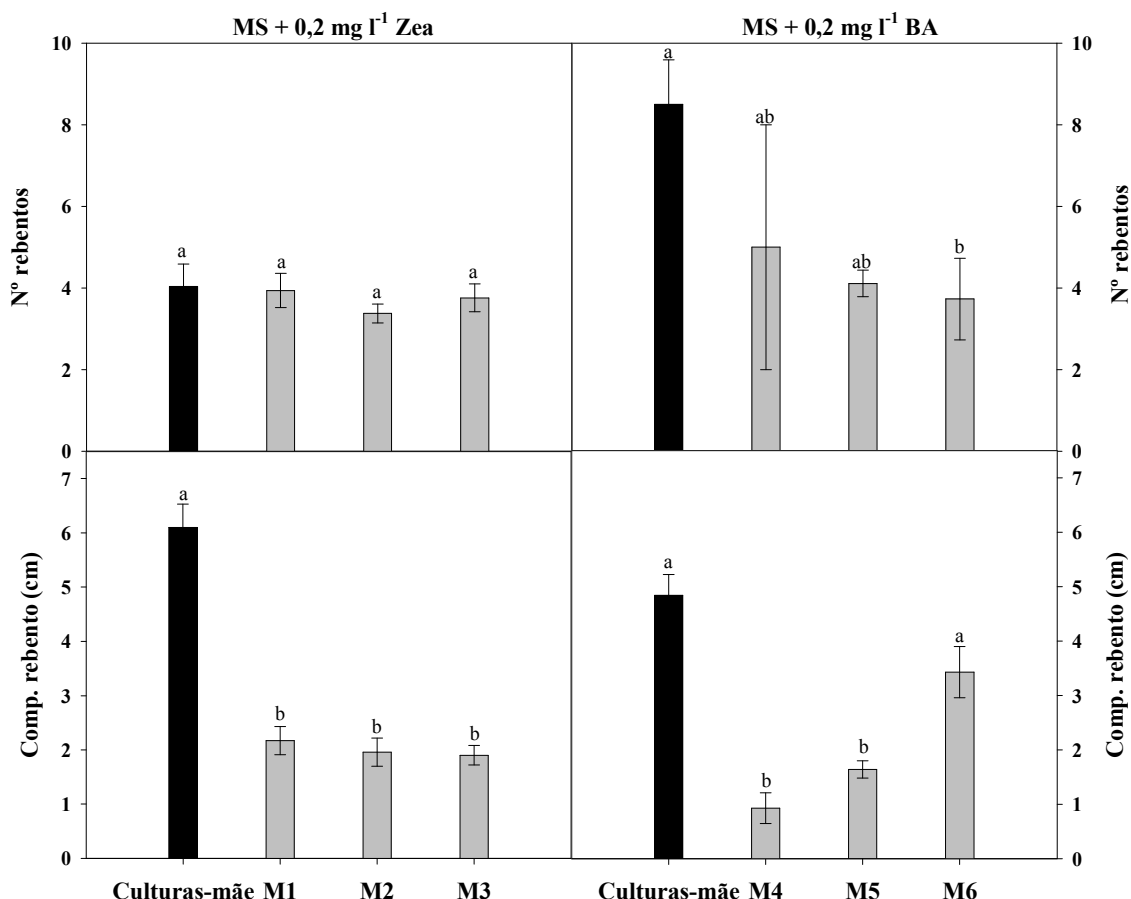


Figura 3.5. Capacidade multiplicativa de rebentos produzidos via organogênese em diferentes meios de cultura, comparativamente com rebentos provenientes da germinação *in vitro* de sementes (Culturas-mãe). Os valores representam médias e as barras verticais representam erros-padrão. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Meios testados - M1: (4 mg l⁻¹ Zea); M2: (4 mg l⁻¹ Zea + 1 mg l⁻¹ IAA); M3: (4 mg l⁻¹ Zea + 1 mg l⁻¹ NAA); M4: (4 mg l⁻¹ BA); M5: (4 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ IAA) e M6: (4 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ NAA).

Relativamente ao número de rebentos desenvolvidos por cada rebento, em ambos os meios de multiplicação não se verificaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$), exceptuando entre as culturas-mãe e o meio M6. Ainda assim, em ambos os ensaios com as culturas-mãe atingiu-se o maior número de rebentos formados, $4,04 \pm 0,55$ e $8,50 \pm 1,09$ para a multiplicação em meio contendo a citocinina Zea e a citocinina BA, respectivamente.

Os rebentos provenientes das culturas-mãe multiplicadas em citocinina Zea obtiveram um maior alongamento dos rebentos ($6,10 \pm 0,43$ cm), apresentando diferenças significativas ($P < 0,05$). Relativamente aos rebentos multiplicados em citocinina BA,

os ensaios com as culturas-mãe e o ensaio com o meio M6 obtiveram um comprimento mais elevado ($4,84 \pm 0,38$ e $3,43 \pm 0,47$ cm, respectivamente), apresentando diferenças significativas ($P < 0,05$). Nos rebentos multiplicados com a citocinina BA observou-se que em meios onde a multiplicação foi mais evidente, o alongamento dos rebentos foi menor.

Outra das vantagens observadas neste método foi o facto de aproximadamente 65% dos rebentos enraizarem em ambos os meios de multiplicação. Assim, nesta fase foram obtidas plântulas que poderão posteriormente ser transferidas para as condições *ex vitro*. Saritha & Naidu (2008) obtiveram igualmente enraizamento aquando da formação de rebentos a partir de explantados foliares de *Spilanthes acmella*.

Efectuando uma análise geral aos resultados, o ensaio com o meio M5 (MS + 4 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ IAA) demonstrou ser o mais adequado para induzir a formação de rebentos a partir de explantados foliares de *P. algarbiensis*, uma vez que permitiu obter o maior número de rebentos por explantado, destacando-se significativamente ($P < 0,05$) dos restantes meios. Esses rebentos demonstraram uma capacidade multiplicativa aceitável, não apresentando diferenças significativas em relação às culturas-mãe multiplicadas em citocinina BA.

Os resultados obtidos, apesar de promissores, poderão possivelmente ser melhorados. Para tal, seriam necessários mais estudos, com diferentes meios e outras combinações citocinina/auxina. Segundo Sreedhar *et al.* (2008) o comprimento do explantado influencia significativamente a formação de rebentos tendo os explantados foliares com 0,6 cm originado maior número de rebentos por cultura. Assim, seria igualmente interessante testar diversos tamanhos de explantado.

3.5. Conclusões

A espécie *P. algarbiensis* encontra-se actualmente em perigo de extinção (Gomes & Ferreira, 2005) apontando-se a elevada expansão urbana como a principal causa. Neste sentido, existe uma grande necessidade no estabelecimento de métodos de conservação para esta espécie considerada de interesse comunitário prioritário.

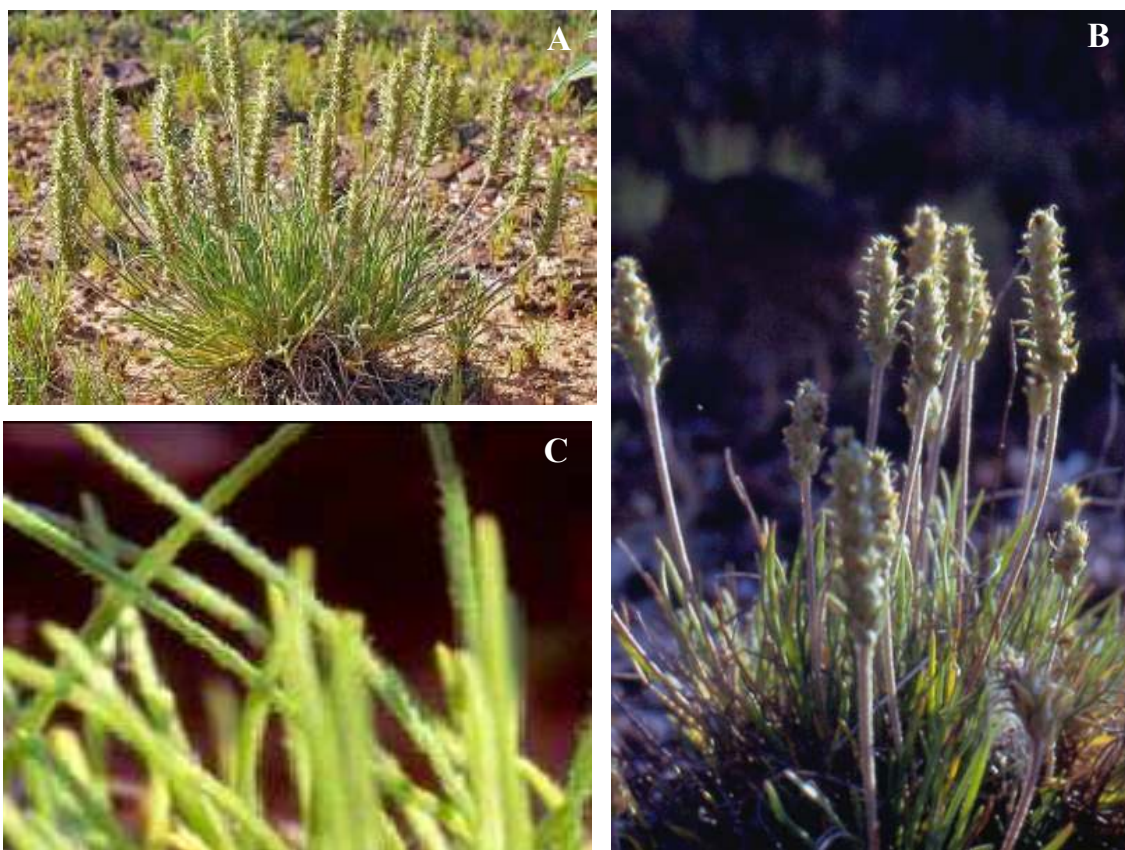
Neste capítulo foi efectuada a germinação de sementes de *P. algarbiensis* em meio 1/4MS e seguida de multiplicação dos germinantes em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ BA. Na fase de germinação ficou demonstrado que a escarificação mecânica é

essencial para obter um aumento da percentagem de germinação. No final da fase de germinação obteve-se um total de 80% de sementes germinadas. O meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ BA demonstrou ser eficaz para multiplicar *in vitro* rebentos de *P. algarbiensis* ($7,21 \pm 0,96$) permitindo obter rebentos em quantidade suficiente para utilizar nos ensaios de organogénese.

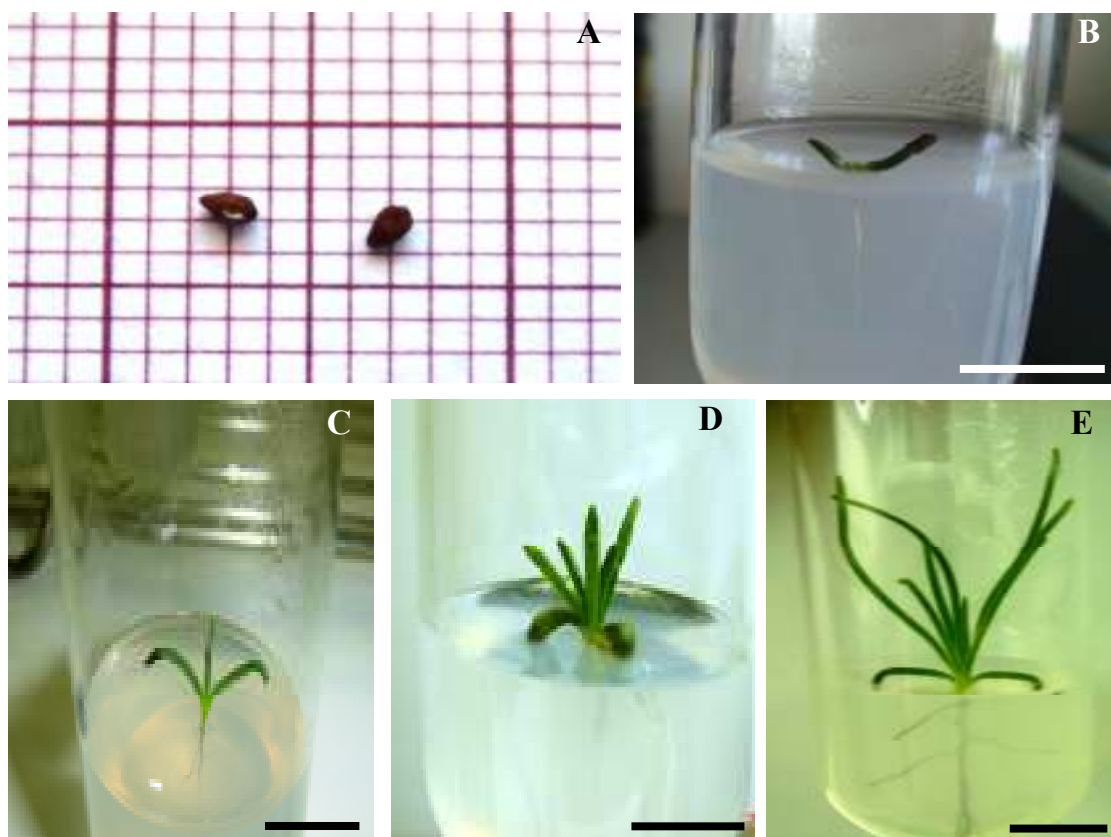
Relativamente à organogénese verificou-se que a maioria dos explantados foliares testados originaram rebentos. No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre os vários meios ($P \geq 0,05$), possivelmente dada a elevada variabilidade de resposta traduzida nos elevados valores de erros-padrão. Seguidamente, através da observação directa (à vista desarmada) verificou-se qual a influência do meio de cultura no número médio de rebentos formados e no seu comprimento. Analisou-se ainda qual a percentagem de rebentos que foi originada directamente a partir de folha ou a partir de *calli*. Finalmente testou-se a capacidade multiplicativa desses mesmos rebentos, inoculando os rebentos em meio MS suplementado com as citocininas Zea ou BA, consoante o meio de proveniência dos rebentos durante a organogénese.

Efectuando uma análise geral aos resultados concluiu-se que o ensaio com o meio M5 (MS + 4 mg l^{-1} BA + 1 mg l^{-1} IAA) demonstrou ser o meio mais adequado para induzir a formação de rebentos a partir de explantados foliares de *P. algarbiensis*, uma vez que permitiu obter o maior número de rebentos por explantado, destacando-se significativamente ($P < 0,05$) dos restantes meios. Esses rebentos demonstraram uma capacidade multiplicativa aceitável, não apresentando diferenças significativas do ensaio das culturas-mãe multiplicadas em meio contendo a citocinina BA. Nesta fase foi igualmente observado enraizamento em aproximadamente 65% dos rebentos em ambos os meios de multiplicação (MS + $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ Zea ou MS + $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ BA). Assim sendo, foram obtidas plântulas que poderão posteriormente ser transferidas para as condições *ex vitro*.

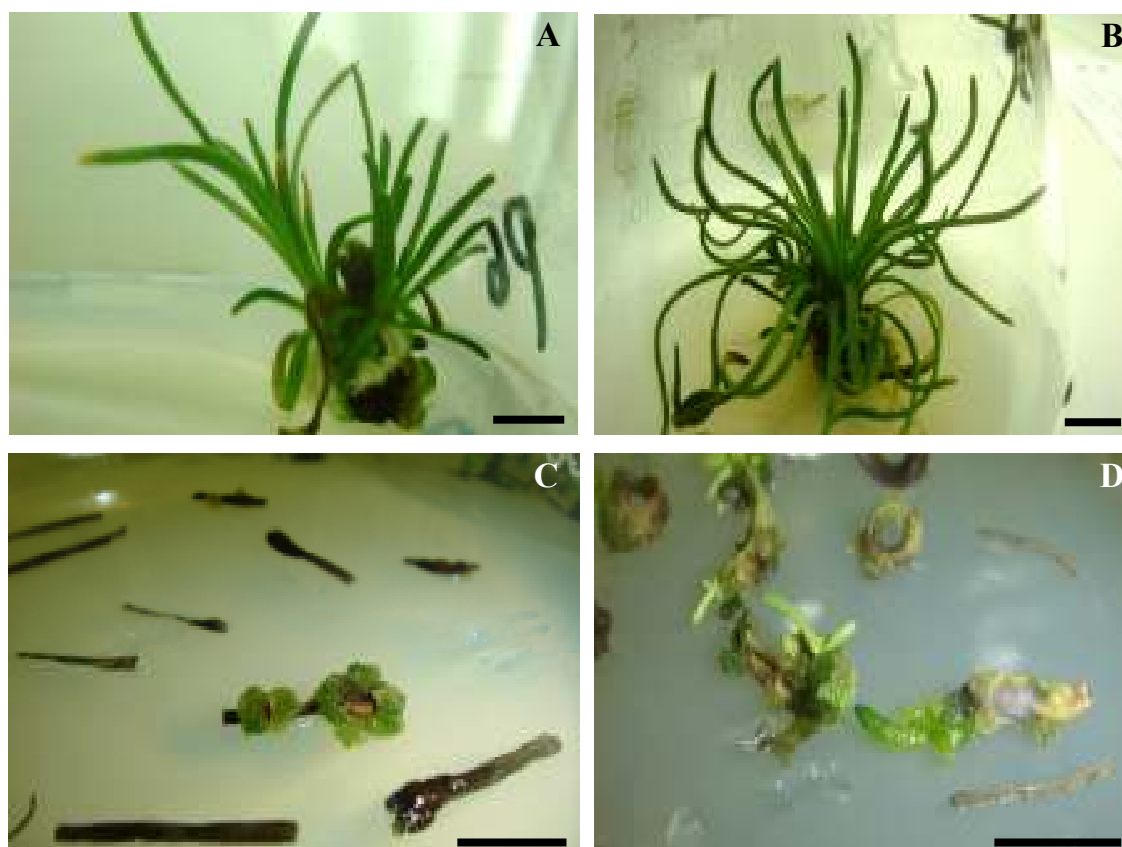
Neste capítulo comprovou-se que a multiplicação *in vitro* via organogénese pode ser um método viável para a propagação de *P. algarbiensis*, visto que pode ser formado um elevado número de rebentos a partir de um único explantado inicial, com capacidade multiplicativa e de enraizamento.



Estampa 3.1. Diferentes aspectos da planta *P. algarbiensis*. (A, B) planta inteira em fase de floração; (C) pormenor da folha



Estampa 3.2. Diferentes aspectos das várias fases de germinação *in vitro* de sementes de *P. algarbiensis* (barra = 1 cm). (A) sementes; (B, C, D, E) plântulas provenientes da germinação de sementes em meio 1/4MS, 2, 3, 4, 5 semanas após inoculação, respectivamente.



Estampa 3.3. Diferentes aspectos da fase de multiplicação *in vitro* e organogénese de *P. algarbiensis*. (A) rebentos na fase de multiplicação em meio MS suplementado com 0,5 mg l⁻¹ BA, 4 semanas após inoculação (barra = 1 cm); (B) rebentos na fase final da multiplicação *in vitro* (barra = 1 cm); (C) formação de calli durante a organogénese a partir de explantados foliares de *P. algarbiensis* (barra = 0,5 cm); (D) formação de rebentos durante a organogénese a partir de explantados foliares de *P. algarbiensis* (barra = 1 cm).

Conclusões gerais

A riqueza e características únicas da área algarvia contribuem para a existência de espécies exclusivas, consideradas de interesse comunitário prioritário. *T. major* e *P. algarbiensis* são duas espécies endémicas algarvias e consideradas em perigo de extinção. Apesar do conhecimento do elevado risco de extinção, pouco ou nada se tem feito com vista à implementação de estratégias de conservação para estas espécies. Com o avanço da área da biotecnologia, tornou-se possível estudar e implementar técnicas de cultura *in vitro* que, por um lado tornaram possível a produção *ex situ* de plantas em larga escala para futura re-introdução nos habitats naturais, e por outro lado a conservação de germoplasma a longo prazo para futura utilização quando necessário, nomeadamente para propagação. Neste contexto, o objectivo central deste trabalho incidiu em estratégias que visassem a propagação e conservação destas espécies.

No capítulo II foi desenvolvido um protocolo de propagação *in vitro* para a espécie *T. major* a partir da germinação de sementes. A propagação *in vitro* a partir de sementes é a via mais comum de conservação *ex situ*, pelo facto desta ser a via natural de propagação para a maioria das espécies de plantas superiores e maximizar a variabilidade genética. Elaborando uma análise geral aos resultados obtidos na micropropagação de *T. major*, concluiu-se que as técnicas testadas podem ser aplicadas com êxito com vista à produção em larga escala de plantas desta espécie. As plantas produzidas por este protocolo foram utilizadas para reforçar populações ameaçadas desta espécie. Ainda no capítulo II testaram-se duas vias de conservação de germoplasma de *T. major*, a criopreservação de sementes e criopreservação de ápices. Dentro da criopreservação de ápices foram testadas três técnicas distintas: vitrificação, vitrificação “droplet” e encapsulamento-desidratação. Os resultados demonstraram que ambas as vias testadas permitiram conservar material que poderá ser utilizado na produção de plantas quando necessário. A criopreservação de sementes não diminuiu a sua capacidade germinativa aumentando a probabilidade de êxito na sua conservação por vários períodos de tempo. Os resultados obtidos na criopreservação de ápices demonstraram que as técnicas testadas são adequadas para a conservação *in vitro* de ápices de *T. major*. Deste modo, torna-se possível constituir uma reserva de germoplasma vegetal, garantindo o uso para fins científicos, re-introdução ou reforço das populações naturais e restauração de habitats. No entanto, estas técnicas poderão

ainda ser melhoradas e aprofundadas de modo a otimizar os resultados. Fazendo uma análise geral ao capítulo II, concluiu-se que as técnicas de cultura *in vitro* são uma ferramenta útil na elaboração de estratégias de conservação para a espécie de *T. major*. Estas técnicas permitem a propagação de plantas *ex situ* em larga escala e possibilitam a conservação de germoplasma desta espécie.

No capítulo III estudou-se a produção de rebentos de *P. algarbiensis* em larga escala. Para tal, foi estudado um protocolo de propagação via organogénese, que visou a produção de rebentos de *P. algarbiensis* a partir de secções de folhas provenientes de rebentos em cultura *in vitro*. Os resultados demonstraram que a organogénese é uma via viável para a produção de rebentos de *P. algarbiensis*. Mais uma vez, as plantas produzidas por esta via poderão posteriormente ser utilizadas no reforço de populações naturais desta espécie em perigo de extinção.

Este trabalho constituiu um pequeno contributo para a conservação de duas das espécies mais exclusivas existentes no Algarve.

Referências bibliográficas

- Carvalho GR, Pasqual M, Resende E, Scarante MJ, Carvalho GR 1999. Aclimatização de plântulas de Cafeeiro (*Coffea arábica* L.) propagadas *in vitro*. Ciência e Agrotecnologia 23: 483-490
- Carvalho-Alves, ECS, Xavier A, Otoni WC 2004. Organogénese do explante foliar de clones de *Eucalyptos grandis* × *E. urophylla*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39: 421-430
- Catarino FM, Carvalho JA, Dias E, Draper D, Fernandes F, Fontinha S, Jardim R, Rosselló-Graell A. 2001. Acções de conservação da flora em Portugal. Em: Campos, CG, Conservación de espécies vegetables amenazadas en la región mediterránea occidental. Una perspectiva desde el fin de siglo, Cap 3, Fundación Ramón Areces
- Christianson ML, Warnick DA 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. HortScience 23: 515-519
- Corral R, Pita JM, Pérez-García F 1990. Some aspects of seed germination in four species of *Cistus* L. Seed Sci. & Technol 18: 321-325
- Couto M, Wagner-Júnio A, Quezada AC 2003. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto Mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.) em casa de vegetação. Revista Brasileira de Agrocência 9: 125-128
- Cuenca S, Amo-Marco JB 2000. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud multiplication. In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant 36:225-229
- Cunha-Lopes S, Lameira OA, Fortes GRL, Nogueira RC, Pinto JBP 2001. Enraizamento *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King). Cerne 7: 124-128
- Das G, Rout GR 2002. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago* species. Plant Cell Tissue and Organ Culture 76: 11-15
- Debergh PC, Maene LJ 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae 14, 335-345

- Debergh PC, Read PE 1991. Micropropagation. Em: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.), Micropropagation, technology and Application, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Delgado JA, Serrano JM, López F, Acosta FJ 2008. Seed size and seed germination in the Mediterranean fire-prone shrub *Cistus ladanifer*. *Plan Ecol* 197: 269-276
- Demeulemeester MAC, Panis BJ, De Proft MP 1992. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Cryoletters* 13, 165-174
- Fabre J, Dereuddre J 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryoletters*, 11: 413-426
- Fay M 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Plant Cellular Development Biology – Plant* 28: 1-4
- Gagliardi RF, Pacheco GP, Carneiro LA, Valls JFM, Vieira MLC, Mansur E 2003. Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of *in vitro*-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants. *Cryoletters* 24: 103-110
- Gaspar T, Coumans M 1987. Root formation. Em: Bonga JM, Durzan DJ (eds.), *Cell and tissue culture in forestry*, 2, Martins Nijhoff Publishers, Dordrecht
- George E, Sherrington P 1984. Plant propagation by tissue culture – Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd, England
- Gomes CJP, Ferreira RP 2005. Flora e Vegetação do Barrocal algarvio (Tavira – Portimão). Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve.
- Gonçalves JC, Diogo G, Amâncio S 1998. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* × *C. Crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae* 72: 265-275
- Gonzalez-Arno MT, Engelmann F, Urra C, Morenza M, Rios A 1998. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. *Cryoletters* 19: 177-182
- González-Benito ME, Iriando JM, Pérez-García F 1998. Seed cryopreservation: an alternative method for the conservation of Spanish endemics. *Seed Science & Technology* 26: 257-262

- González-Benito ME, Martín C, Iriondo JM, Pérez C 2001. Conservation of the rare and endangered plants endemic to Spain. Em: Campos CG, Conservación de espécies vegetales amenazadas en la región mediterránea occidental. Una perspectiva desde el fin de siglo, Cap 16, Fundación Ramón Areces.
- González-Benito ME, Pérez C 1994. Studies on the cryopreservation of nodal explants of *Centaureum rigualli* Esteve, an endemic threatened species through vitrification. Botanic gardens micropropagation news. Vol. I cap. 7
- González-Benito ME, Pérez-García F 2001. Cryopreservation of lipid-rich seeds: Effect of moisture content and cooling rate on germination. Cryoletters 22: 135-140
- Hameed N, Shabbir A, Ali A, Bajwa R 2006. *In vitro* propagation of disease free rose (*Rosa indica* L.). Mycopath 4: 35-38
- Hirai D, Shirai K, Shirai S, Sakai A 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation - vitrification. Euphytica 101, 109-115.
- Instituto de Conservação da Natureza (ICN) 2006. Em: <http://portal.icnb.pt/ICNPortal/vPT2007/>, consultado pela última vez a 21-08-2008
- Iriondo JM, Moreno C, Perez C 1995. Micropropagation of 6 *Rockrose* (*Cistus*) species. HortScience 30: 1080-1081
- Langis R, Schnabel B, Earle ED, Steponkus PL 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. Cryoletters 10: 421-428
- Leunufna S, Keller ERJ 2003. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). Plant Cell Reports 21: 1159-1166
- López IS, Luis JC, Armas MR, González FV 2004. *In vitro* propagation of *Helianthemum bystropogophyllum* Svent., a rare and endangered species from Gran Canaria (Canary islands). Botanica Macaronésica 25: 71-77
- Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C, Yamada K 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. Cryoletters, 16: 189-196.
- Mkada J, Dorion N, Bigot C 1991. *In vitro* propagation of *Cistus-Purpureus* Lam. Scientia Horticulturae 46: 155-160

- Morte MA, Honrubia M 1992. *In vitro* propagation of *Helianthemum almeirensense* Pau (Cistaceae). *Agronomie*, 12: 807-809
- Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen 15: 473-497
- Nadal P, Sanchis E, Pérez-García F, Fos M 2002. Effect of dry-heat, soaking in distilled water and gibberellic acid on the germination of *Cistus clusii*, *C. monspeliensis* and *C. salvifolius* seeds. *Seed Science & Technology* 30: 663-669
- Niino T, Sakai A, Yakuwa H, Nojiri K 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 261-266
- Niino T, Tashiro K, Suzuki M, Ohuchi S, Magoshi J, Akihama T 1997. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Scientia Horticulturae* 70: 155-163
- Panis B, Lambardi M 2006. The role of Biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Panis B, Piette B, Swennen R 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168: 45-55
- Paulet F, Engelmann F, Glaszmann JC 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Report* 12: 525-529
- Perez SCJGA 2004. Envoltórios. Em: Ferreira AG, Borghetti F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre 125-134
- Pérez-García F 1997. Germination of *Cistus ladanifer* seeds in relation to parental material. *Plant Ecology* 133: 57-62
- Pérez-García F, Escudero A 1997. Role of the seed coat in germination of *Cistus populigolius* L. *Israel Journal of Plant Sciences* 45: 329-331
- Pérez-García F, González-Benito ME 2005. Effects of temperature and different pré-treatments on seed germination of four *Halimium* species. *Seed Science & Technology* 33: 505-509

- Pérez-García F, González-Benito ME 2006. Seed germination of five *Helianthemum* species: Effect of temperature and presowing treatments. *Journal of Arid Environments* 65: 688-693
- Pérez-García F, González-Benito ME 2008. Seed cryopreservation of *Haliumium* and *Helianthemum* species. *Cryoletters* 29: 271-276
- Pessoa FS, Pinto JR, Alexandre JR 2004. Plantas do Algarve com interesse ornamental, edições Afrontamento
- Pierik RLM 1987. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Martinus Nyhoff Publisher
- Pospisilová J, Tichá I, Kadlec P, Haisel D, Plzáková S 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497
- Ravichandran P, Manimekalai V. 2005. Plant biotechnology and conservation of biodiversity. Em: William SJ. Biodiversity: Life to our mother earth, Índia
- Reinhoud PJ, Schrijnemakers EWM, Iren FV, Kijne JW 1995. Plant vitrification and heat-shock treatment improve cryopreservation of *tobacco* cell suspensions compared to two-step freezing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42: 261-267
- Sakai A, Matsumoto T, Hirai D, Niino T 2000. Newly development encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *CryoLetters* 21, 53-62.
- Sakai A, Engelmann F 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *Cryoletters* 28: 151-172
- Sant R, Panis B, Taylor M 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet-vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 107-111
- Saritha KV, Naidu CV 2008. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Spilanthes acmella*. *Biologia Plantarum* 52: 334-338
- Schriknemakers EWM, Van Iren F 1995. A twostep or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. Em: Day JG, McLellan MR (eds.), *Methods in Molecular Biology*, 38, Cryopreservation and freeze-drying protocols (.). Humana Press, Totowa, NJ

- Siguero PL 1991. Consejos y recomendaciones para reforestar com espécies autóctonas. *Quercus* 62: 52-53
- Souza ERB, Zago R, Garcia J, Farias JG, Carvalho SEM, Barroso MR 2007. Efeito de métodos de escarificação do tegumento em sementes de *Leucaena diversifolia* L.. Pesquisa Agropecuária Tropical 37: 142-146
- Sreedhar RV, Venkatachalam L, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Narayan MS, Ravishankar GA 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. *Biologia Plantarum* 52: 355-360
- Sujatha M, Dinesh Kumar V 2007. *In vitro* bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary buds. *Biologia Plantarum* 51: 782-786
- Thomé, GCH, Gressler PD, Santos G 2004. Propagação *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., via organogénese. *Revista Brasileira de Agrociência* 10: 197-202
- Uragami A, Sakai A, Nagai M, Takahashi T 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports* 8: 418-421
- Vandenbussche B, Demeulemeester MAC, De Proft MP 1993. Cryopreservation of alginate-coated *in vitro* growth shoot tips of Chicory (*Cichorium intybus* L.) using rapid freezing. *Cryoletters* 14: 259-266
- Vater G, Arena M 2005. *In vitro* propagation of *Rubus geoides*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 33: 277-281
- Walter KS, Gillet HJ (eds.) 1997. Red List of Threatened Plants. IUCN.
- Zygomala AM, Ioannidis C, Koropouli X 2003. *In vitro* propagation of *Cistus creticus* L.. Proceedings of the first international symposium on acclimatization and establishment of micropropagated plants

Anexo

Composição basal do meio MS (Murashige & Skoog, 1962)

Componentes	mg l ⁻¹
Macronutrientes	
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
H ₃ BO ₃	6,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
KI	0,83
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Fonte de ferro	
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Aditivos	
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina.HCl	0,5
Tiamina.HCl	0,1
Glicina	2
Agar	7000
Sacarose	20000